



令和6年9月16日
明治薬科大学, 東京

第25回応用薬理シンポジウム

再生医療の臨床応用・品質確保に 薬理学の考え方を生かす

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。

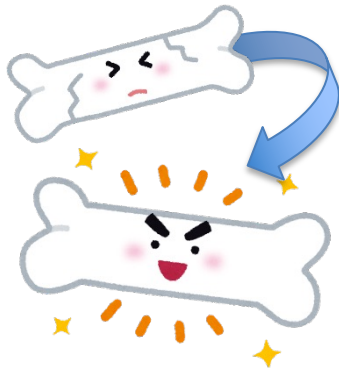
応用薬理シンポジウム COI開示

筆頭発表者：佐藤 陽治
責任発表者：佐藤 陽治

発表内容に関連し，過去3年間，開示すべき
COI関係にある企業などはありません。

「再生医療」と「細胞治療」

「再生医療」



加齢、疾病、損傷、または先天的障害により、組織・器官が**失った機能を修復ないし置換することを目的に**、
機能的かつ生きている組織を作り出すプロセス

[ヨーロッパ科学財団の定義]

「細胞治療」



体外で加工または改変された自己由来、同種由来または異種由来の**細胞を投与することによって**ヒトの疾病または損傷を予防、処置、治療ないし緩和すること

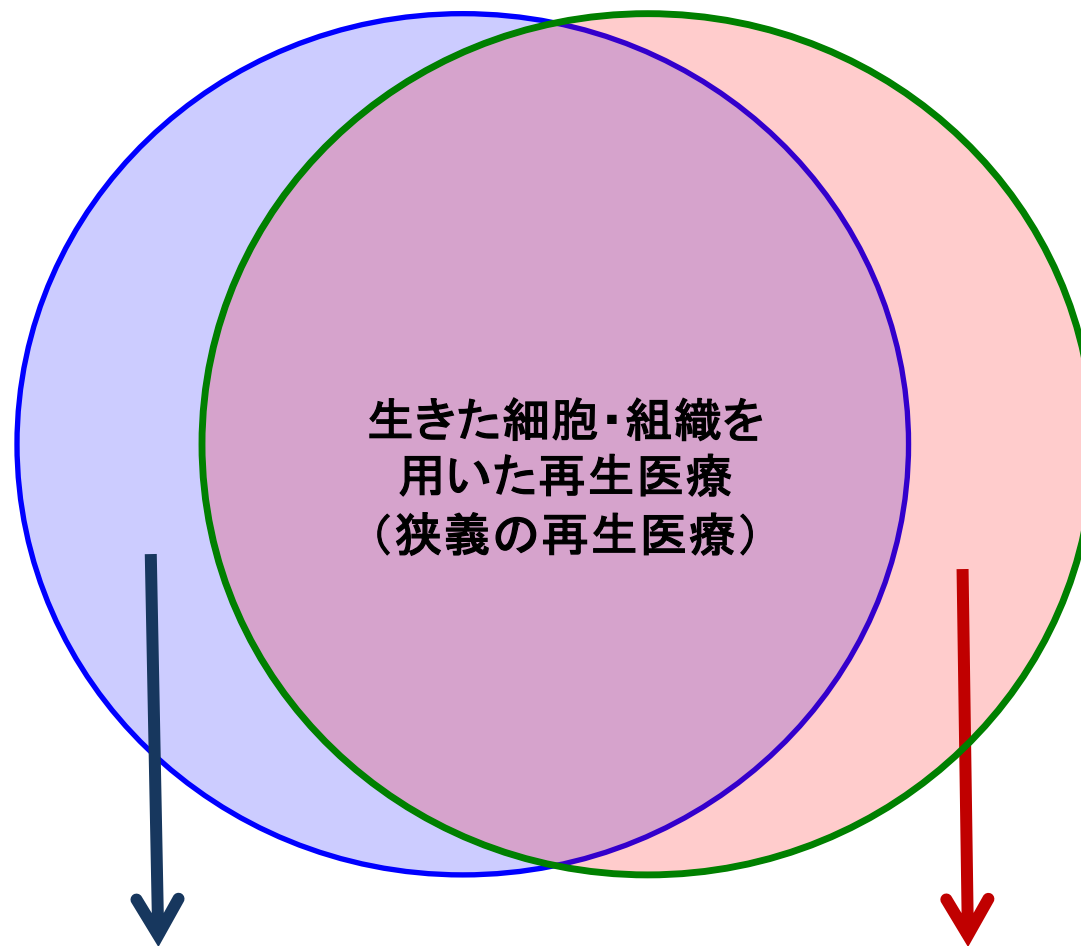
[米国食品医薬品局(FDA)の定義]

再生医療
regenerative medicine

細胞治療
cell therapy



細胞加工製品
(細胞加工物)



生きた細胞・組織を
用いた再生医療
(狭義の再生医療)

加工（培養・活性化・分化誘導など）

あり

なし

細胞・組織
[輸血・移植医療]



生きた細胞を使わない再生医療
(例: 細胞を活性化させる因子を投与し、
患者の体内で組織を再生させる方法)

臓器や組織の再生を目的としない細胞治療
(例: 免疫細胞の投与によるがん治療)

再生医療
regenerative medicine

細胞治療
cell therapy

「薬事法」→「薬機法」
(平成26年11月)

再生医療等製品

遺伝子治療用製品
細胞加工製品
(細胞加工物)

生きた細胞・組織を
用いた再生医療
(狭義の再生医療)

加工（培養・活性化・分化誘導など）

あり

なし

細胞・組織
[輸血・移植医療]

生きた細胞を使わない再生医療
(例:細胞を活性化させる因子を投与し、
患者の体内で組織を再生させる方法)

臓器や組織の再生を目的としない細胞治療
(例:免疫細胞の投与によるがん治療)

細胞加工製品の実用化の課題



- 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

細胞の特性
(＝主成分の特性)
を知らないと、製造時に
何を指標に品質管理した
らよいか分からない！

細胞加工製品の代表的な特性

最終製品のロット間や
原料／中間製品のロット間の
品質のばらつき

「製品／原料の不均質性」

最終製品中の個々の細胞の間や
原料／中間製品中の
個々の細胞の間の形質のばらつき

「細胞集団の不均一性」





- 1874年 「東京司薬場」として設立
- 日本で最も古い国立試験研究機関

➤ 歴代所長

テトロドトキシン
分離成功

東京帝都復興計画

エフェドリン発見者



永松東海(初代)、柴田承桂(2代)、後藤新平(5代)、
長井長義(6代)、田原良純(7・9代)...

石館守三(16代)、内山充(21代)、寺尾允男(22代)、
首藤紘一(23代)、長尾拓(24代)、
本間正充(31代・現所長)



日本初の世界的
ブロックバスター
循環器病治療薬
「ヘルベッサ」
(塩酸ジルチアゼム)
の開発

ハンセン病治療薬
としての「プロミン」
(グルコシルホン
ナトリウム)の開発

学問としての「再生医学」は今の段階にあるのか？

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、**有効性に関連する品質特性（重要品質特性, CQA）を発見しやすくなる**

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^{1,2,‡}, Tsukasa Kouno^{3,‡}, Megumi Takano¹, Takuya Kuroda¹, Yumiko Yamamoto³, Shinji Kusakawa¹, Masaki Suimye Morioka³, Tohru Sugawara^{2,4}, Takamasa Hirai¹, Satoshi Yasuda¹, Rumi Sawada¹, Satoko Matsuyama^{1,5}, Hideya Kawaji^{3,6}, Takeya Kasukawa³, Masayoshi Itoh³, Akifumi Matsuyama⁵, Jay W. Shin^{3,7}, Akihiro Umezawa², Jun Kawai^{3,8}, Yoji Sato^{*,1,8,9}

¹Division of Cell-Based Therapeutic Products, National Institute of Health Sciences, Kanagawa, Japan

²Center for Regenerative Medicine, National Center for Child Health and Development, Tokyo, Japan

³RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, Yokohama, Japan

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

⁵Center for Reverse TR, Osaka Habikino Medical Center, Osaka Prefectural Hospital Organization, Osaka, Japan

⁶Research Center for Genome & Medical Sciences, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japan

⁷Genomic Institute of Singapore, Agency for Science, Technology and Research, Singapore

⁸Life Science Technology Project, Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology, Kawasaki, Japan

⁹Department 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

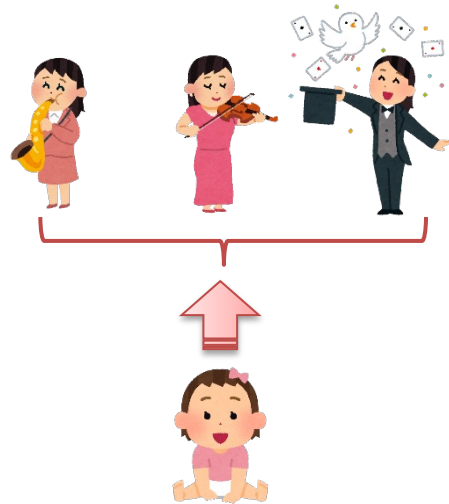
‡Contributed equally.

再生医療・細胞治療と「幹細胞」

提供者(ドナー)の不足などから、細胞があまり増えない臓器(例えば心臓や脳)の細胞は、治療に必要なだけの生きた分を実際に手に入れるのは簡単ではありません。

「体の外(試験管の中など)で増やせないのか？」

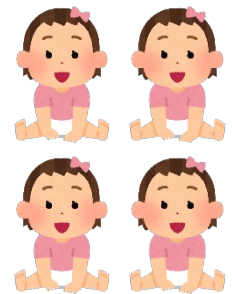
⇒実は、心臓や脳などに成熟する前の細胞(未分化な細胞)は増やすことができます。



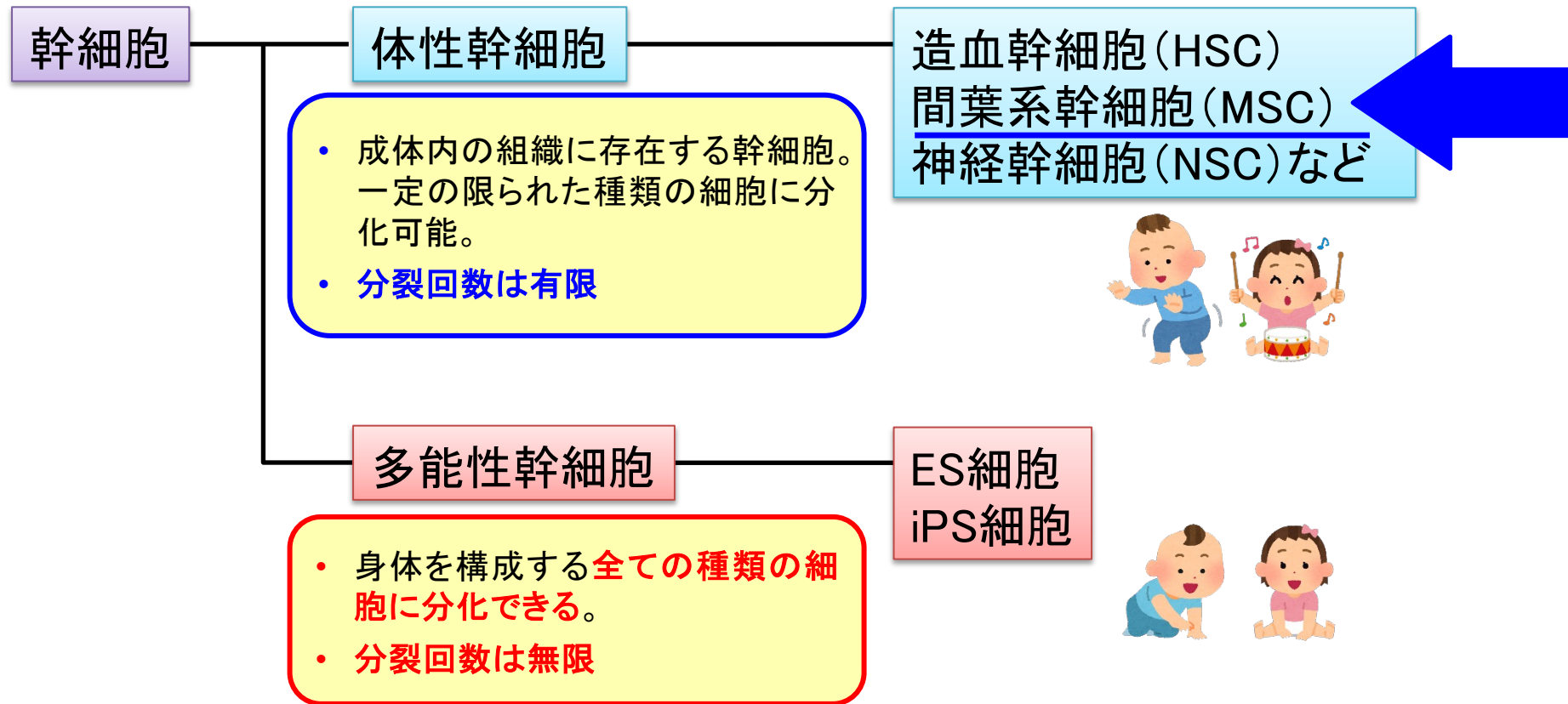
幹細胞とは、

- ①分裂して自分自身をコピーする「自己複製能力」と
- ②様々な細胞へと変化する「分化能力」を併せ持つ
- ③「未分化な細胞」

のことです

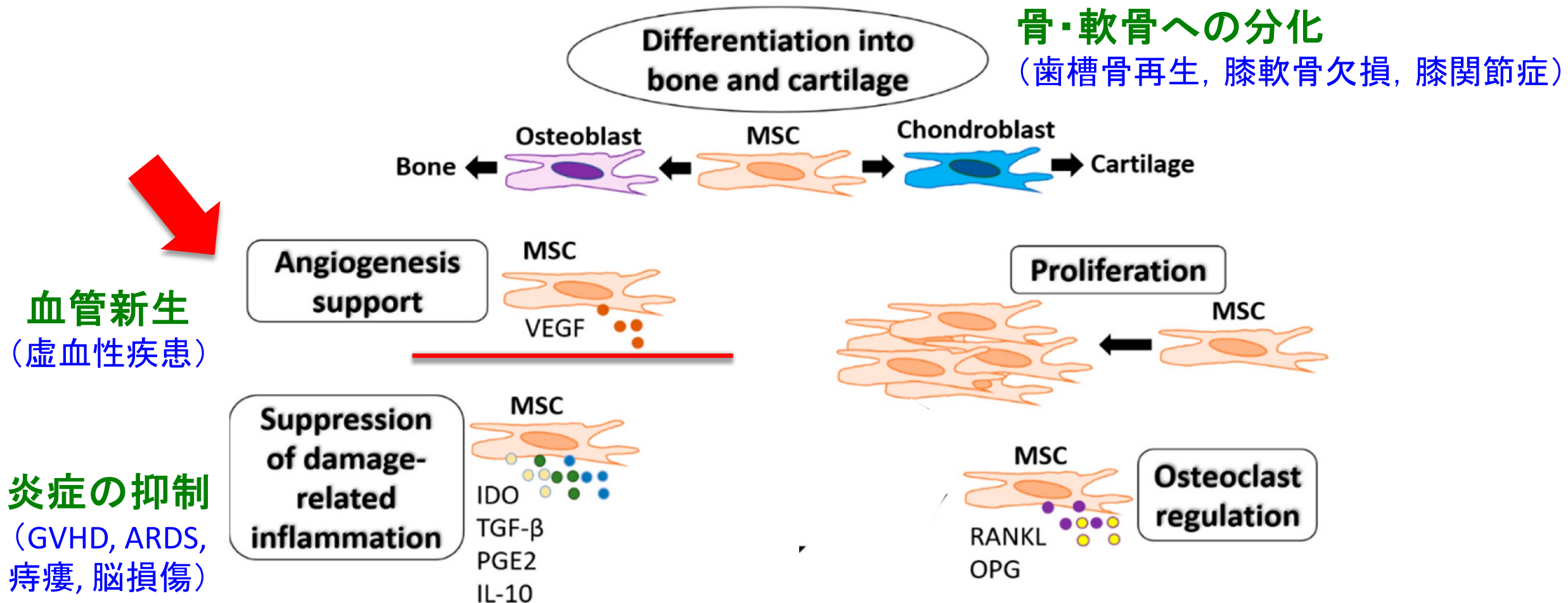


再生医療・細胞治療と「幹細胞」



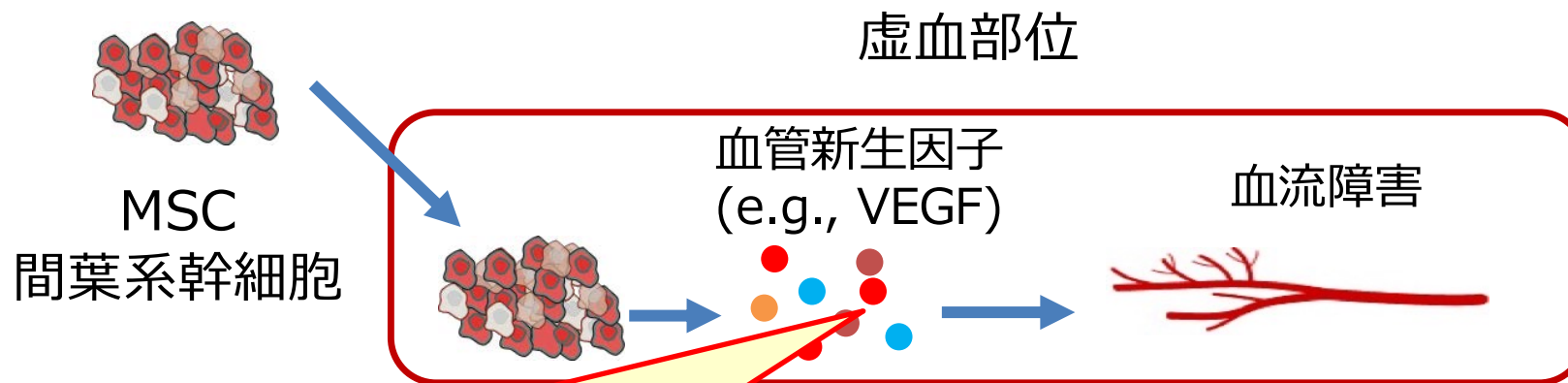
MSC(間葉系幹細胞／間葉系間質細胞)の様々な機能

<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）

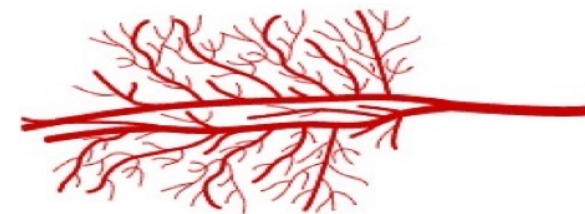


VEGF（血管内皮細胞増殖因子;
vascular endothelial growth factor）

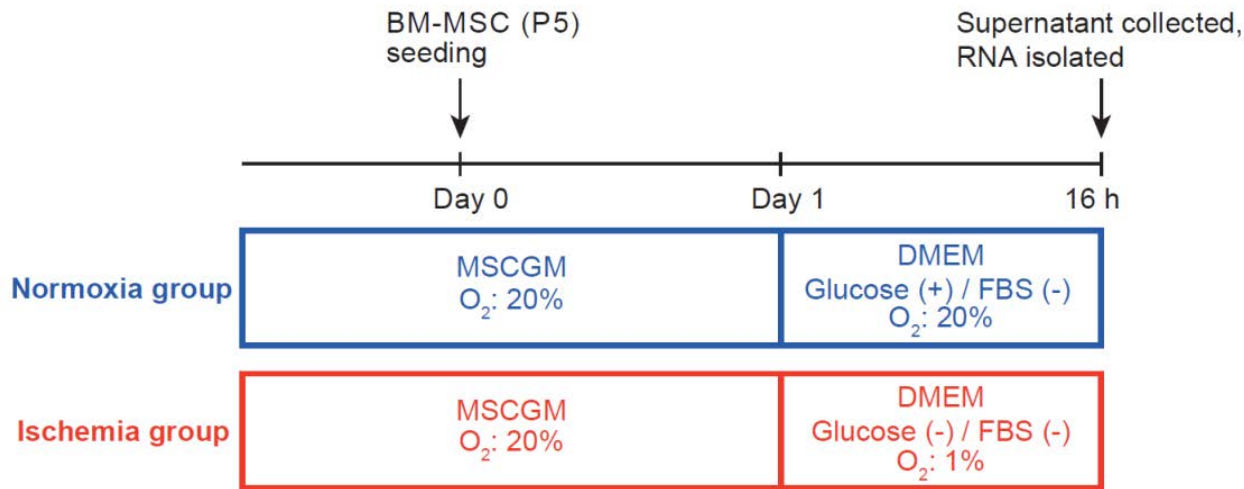
血管新生を促すタンパク質です。VEGFが血管内皮細胞に作用すると、細胞の分裂や遊走、分化などを誘導し、その結果、既存の血管から枝分かれした新たな血管が形成されます（血管新生）。

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

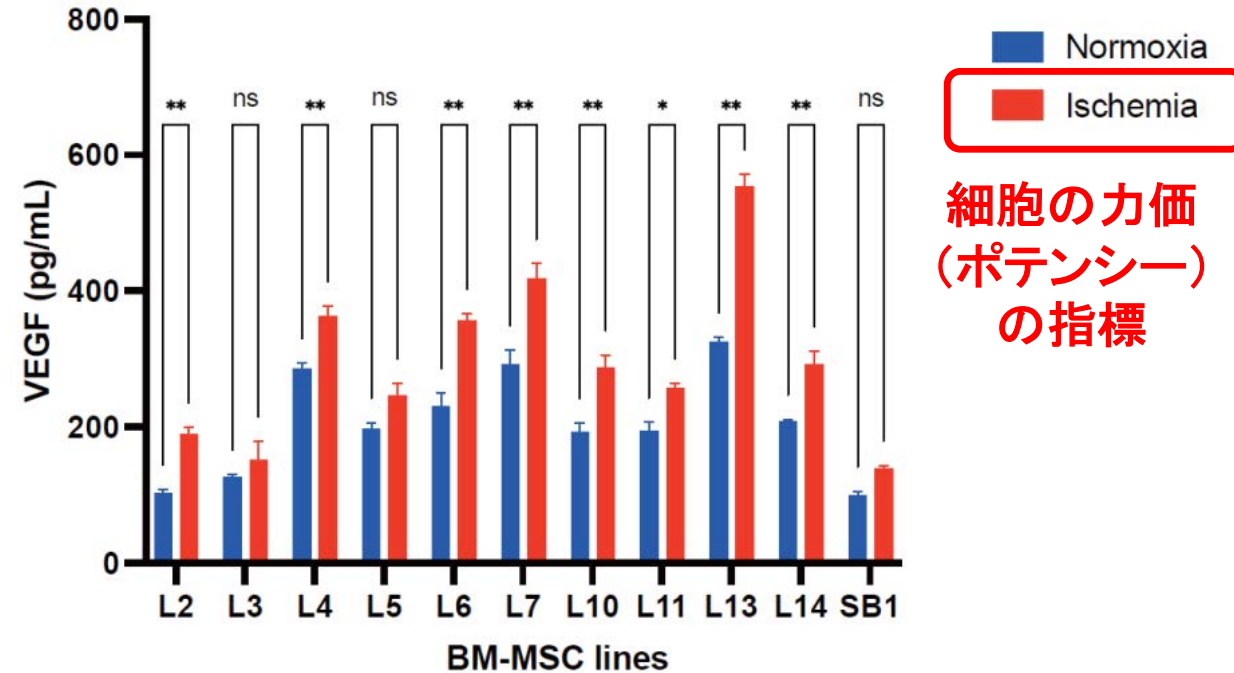
血管新生



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

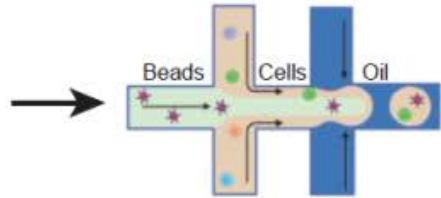
シングルセル・トランスクリプトーム解析

通常酸素分圧
& 通常培地環境下の
骨髄由来MSCs



BM-MSCs (P5)

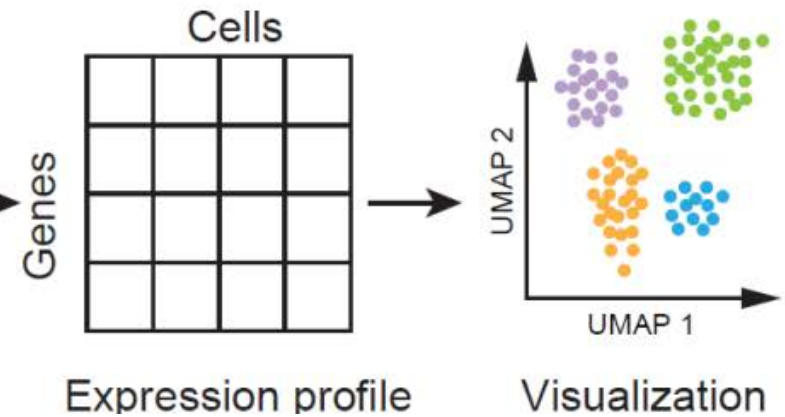
11ロット



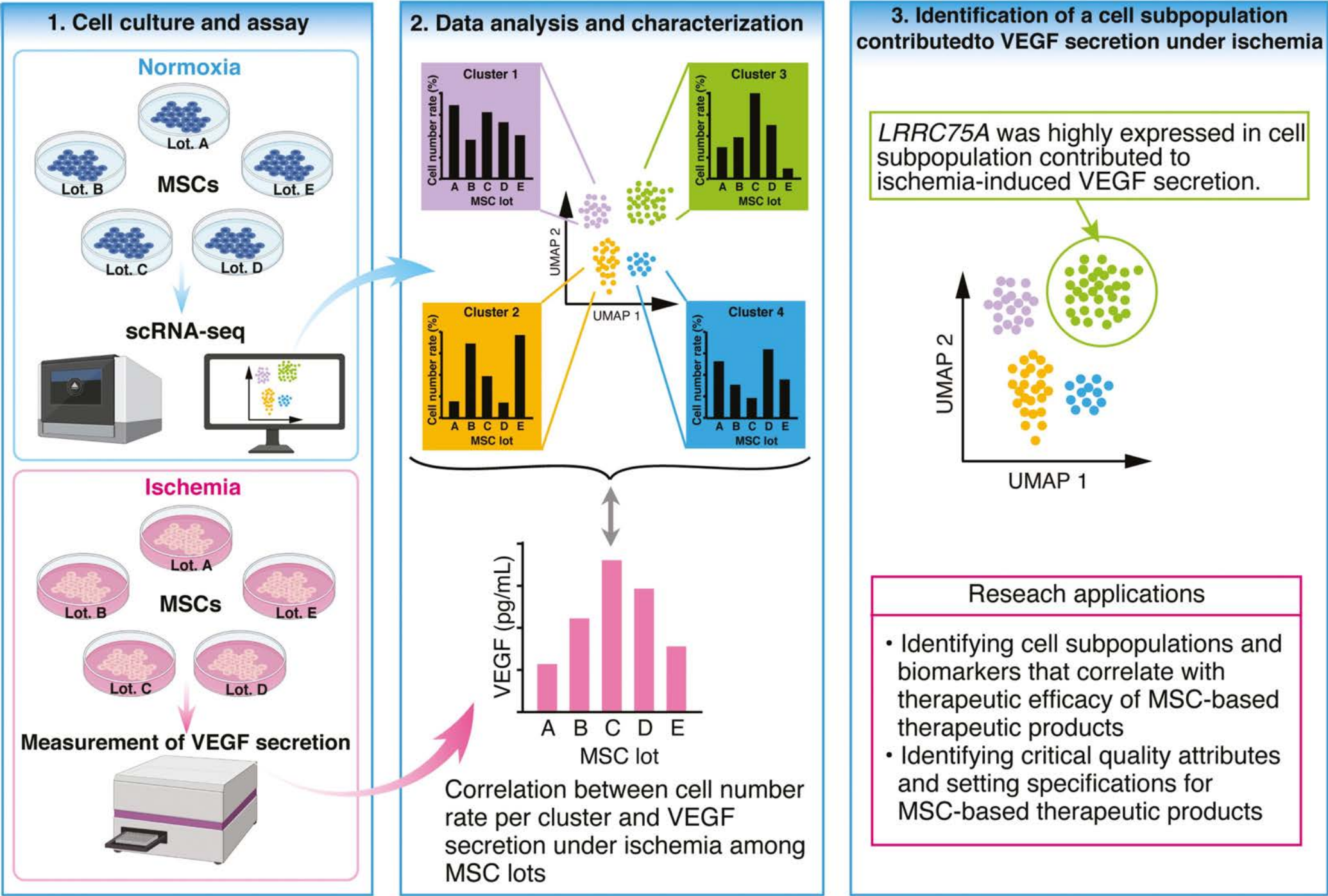
Single cell libraries



Sequencing



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



研究で使用した
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

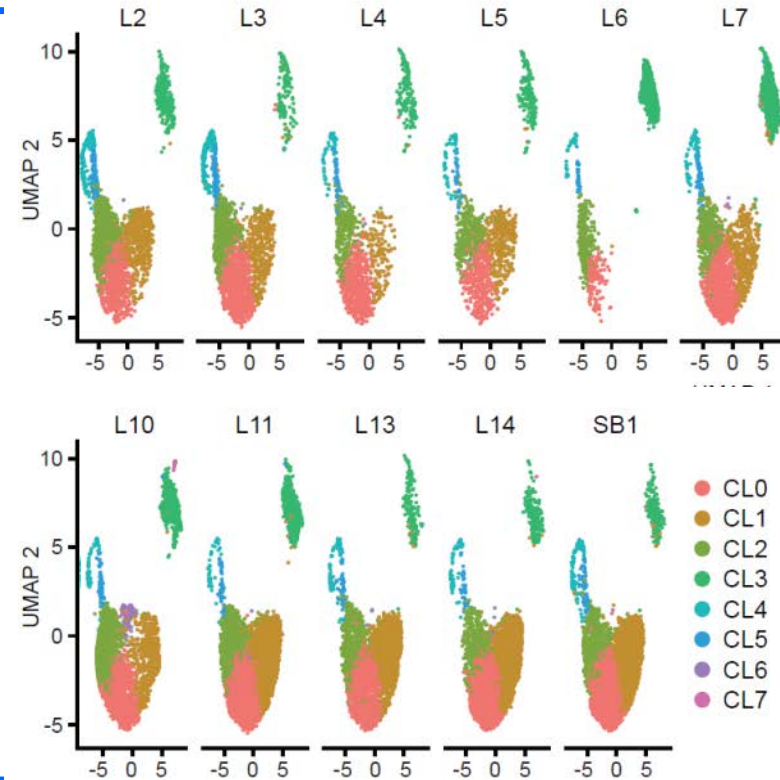
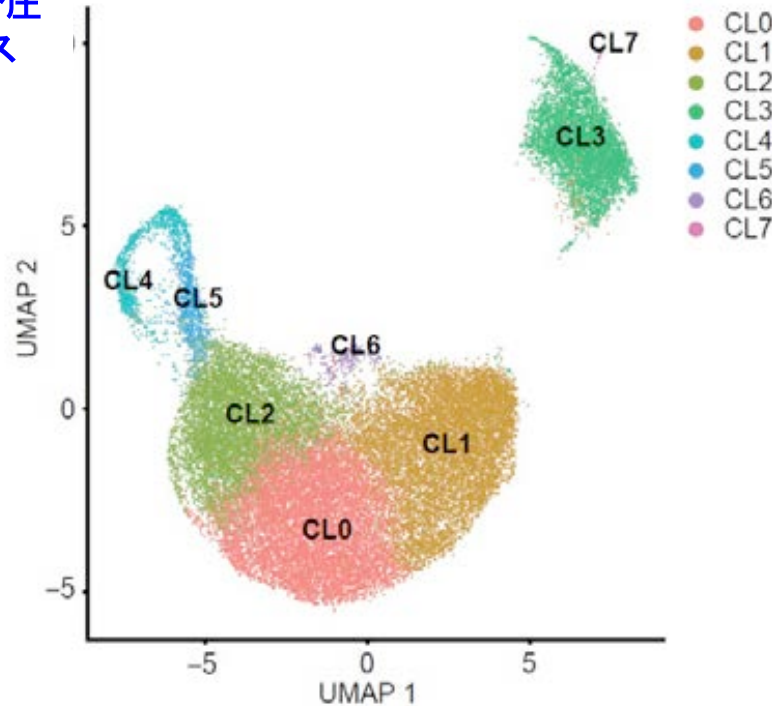
BM-MSCs

(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)

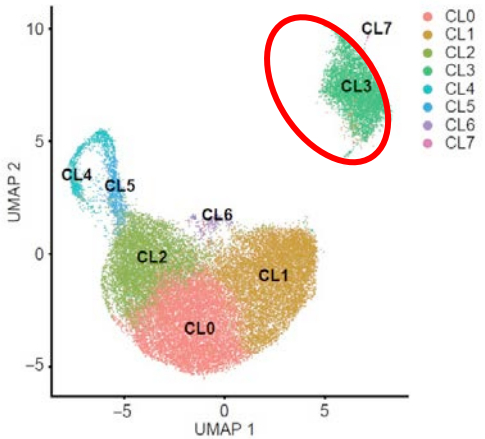
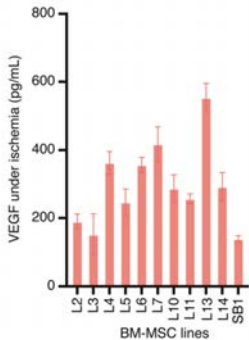
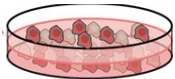
骨髄由来hMSCの母集団は、**8個程度の
クラスターに分類できる**と推定できる

「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

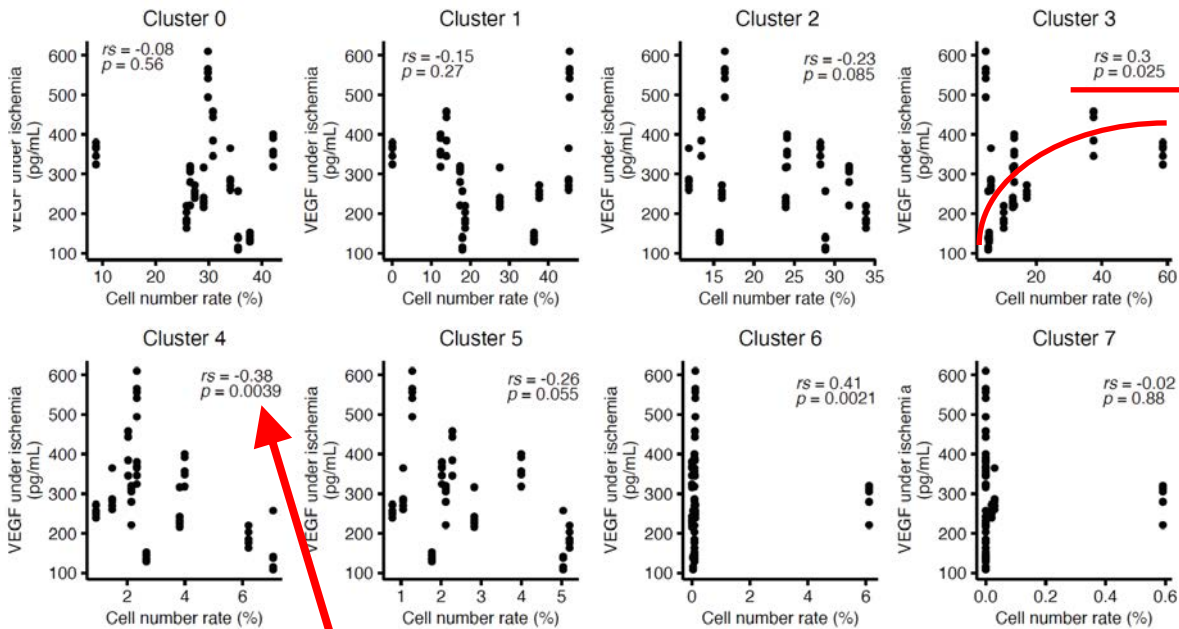
シングルセル・トランスクリプトーム解析

(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(-)



用量-作用曲線！

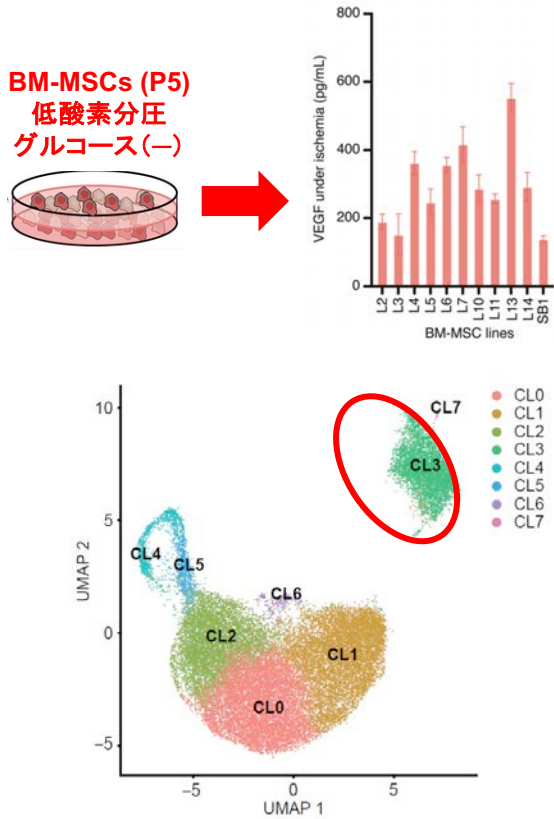


スピアマン順位相関係数
(&その有意確率)

(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・トランスクリプトミクス

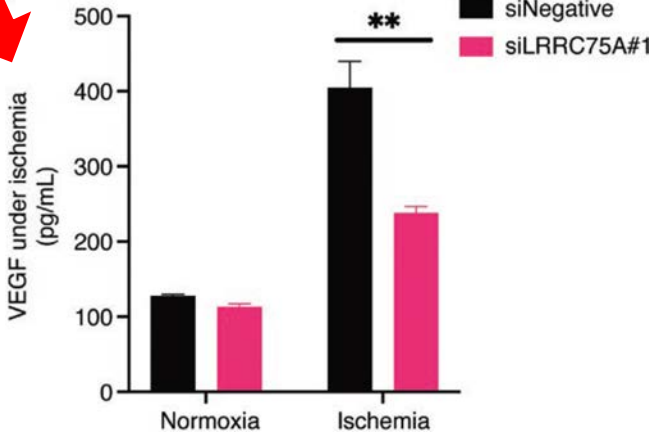
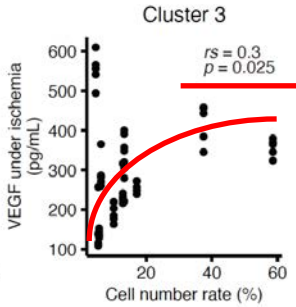
隠れていた**重要品質特性**
Critical Quality Attributes (CQAs)



CL3で発現上昇している遺伝子
トップ20

Gene name	Ave log ₂ FC
LRRC75A	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

LRRC75Aは虚血環境下の
VEGF分泌に生理的に寄与



機能阻害実験！

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



研究で使用した
特定ロットの *hMSC*
(= 特定の検体)



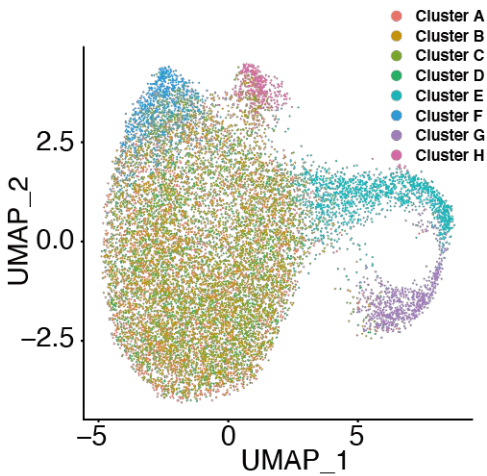
トレーニングセット



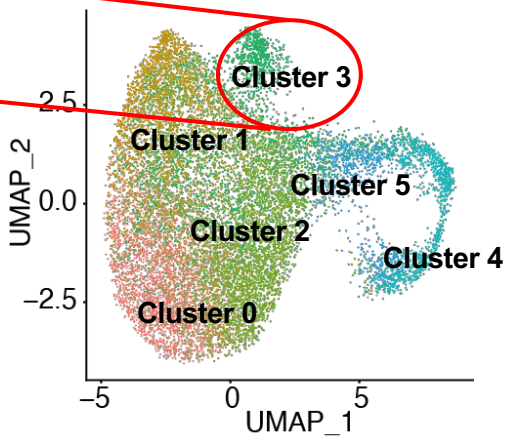
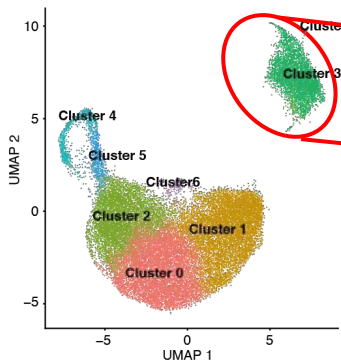
テストセット

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)



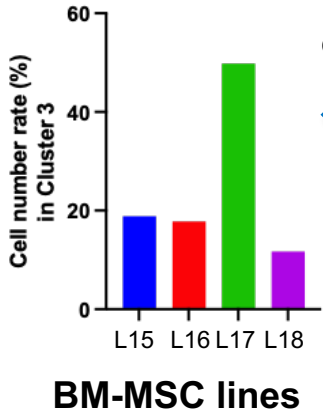
Reference Data Set
(L2–SB1)



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

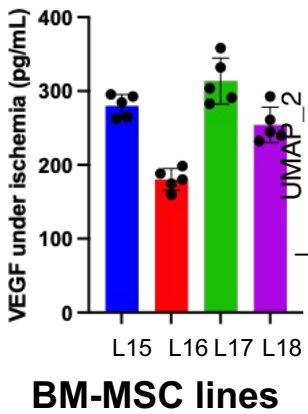
別セットの骨髄由来hMSC (BM-MSC) におけるCL3様細胞の同定

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

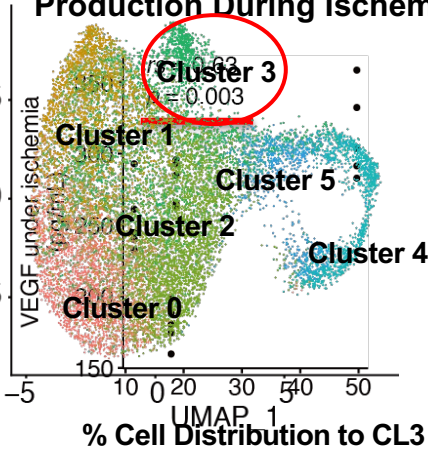


correlation

VEGF Production in
Each Line
(During Ischemia)



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

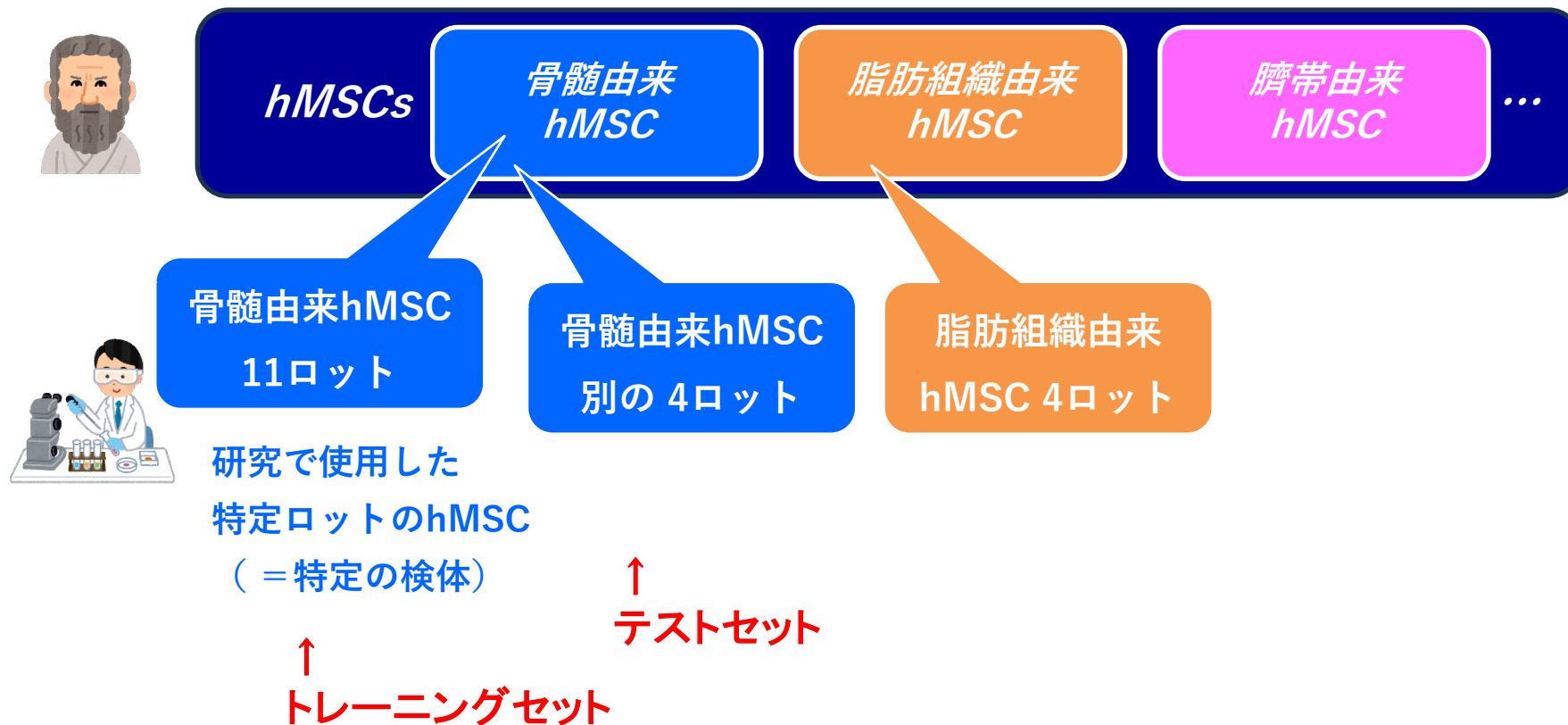


hMSC（ヒト間葉系幹細胞／間葉系間質細胞）の科学

仮説

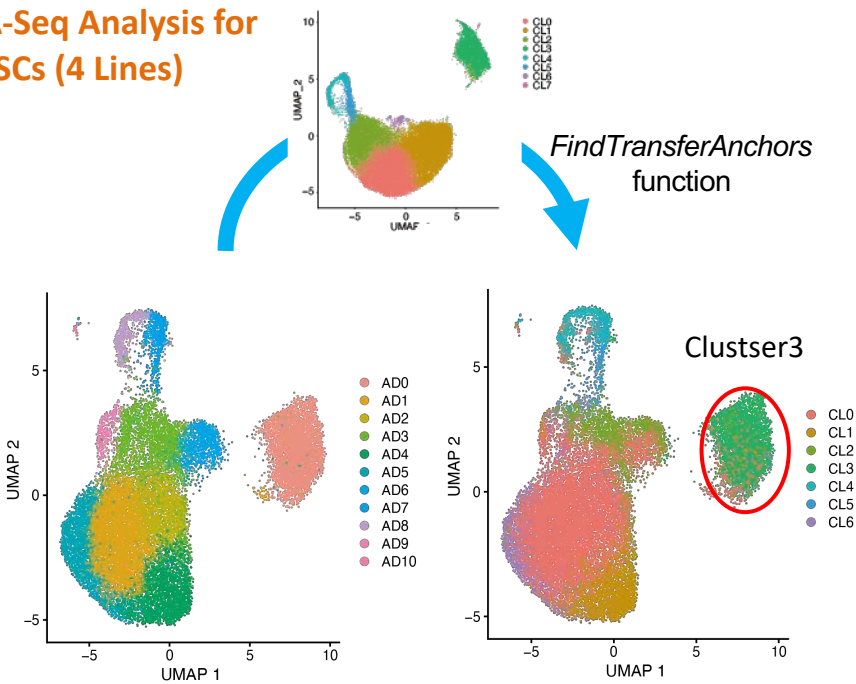
CL3で発現する *LRRC75A* は、
虚血下での *hMSC* からの VEGF の分泌を制御する

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*』

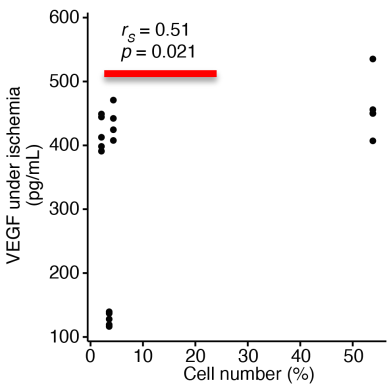


脂肪組織由来hMSC (AD-MSC) におけるCL3様細胞

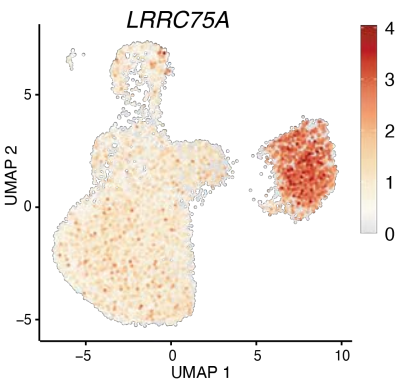
scRNA-Seq Analysis for
AD-MSCs (4 Lines)



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

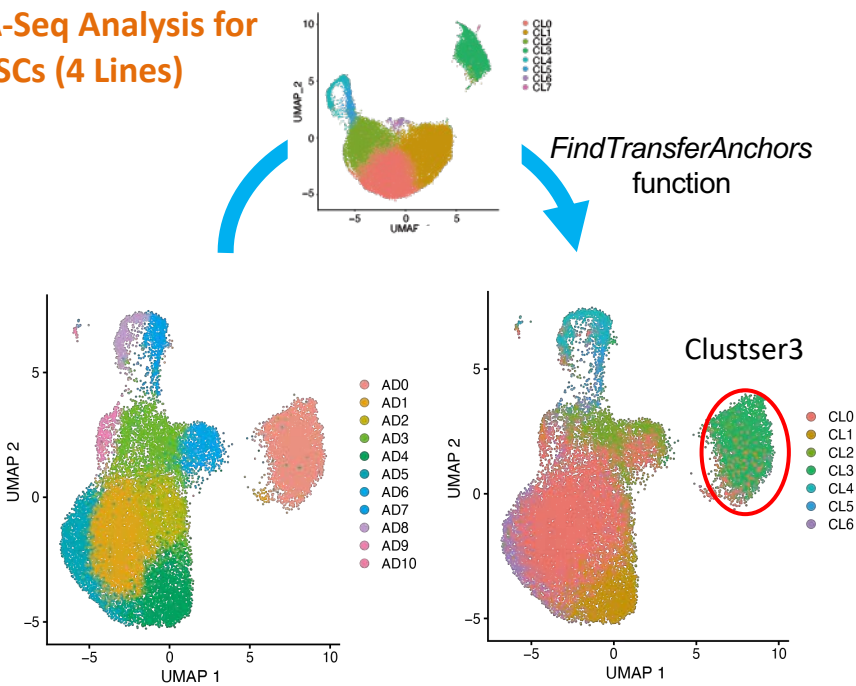


Expression of *LRRC75A*
in AD-MSCs

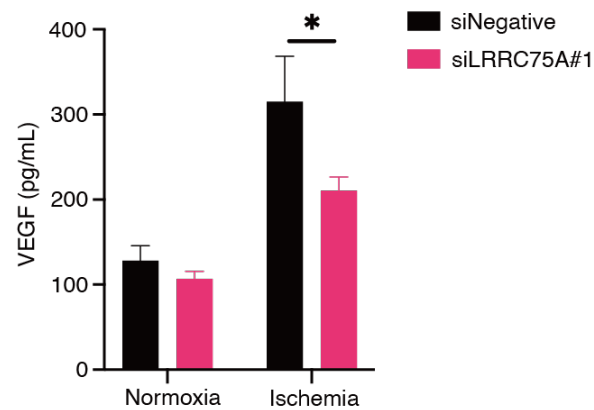


脂肪組織由来hMSC (AD-MSC) におけるCL3様細胞

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



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



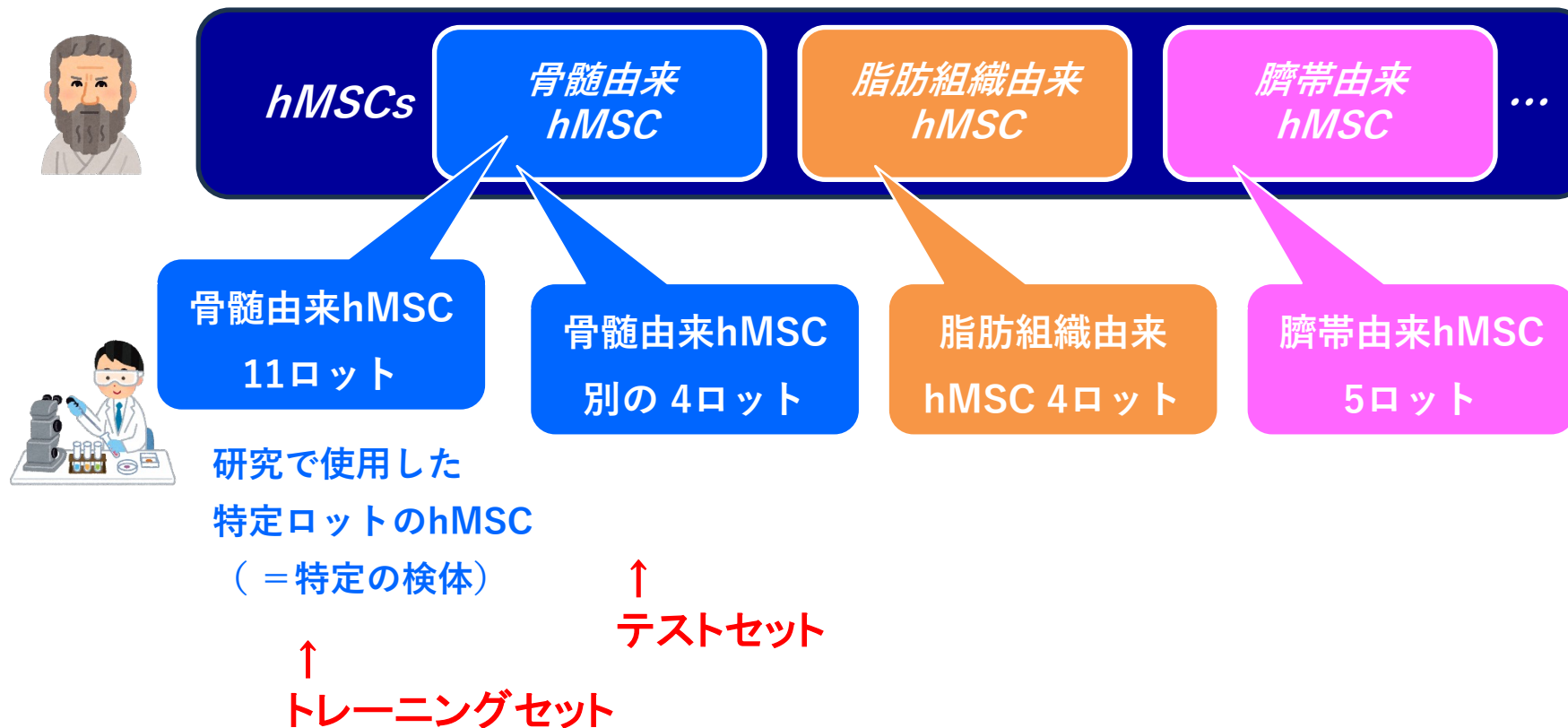
- In AD-MSCs,
- CL3-like cells contribute to VEGF production under ischemia.
 - The expression of *LRRC75A* is high in CL3-like cells.
 - KD of *LRRC75A* suppresses the secretion of VEGF.

hMSC（ヒト間葉系幹細胞／間葉系間質細胞）の科学

仮説

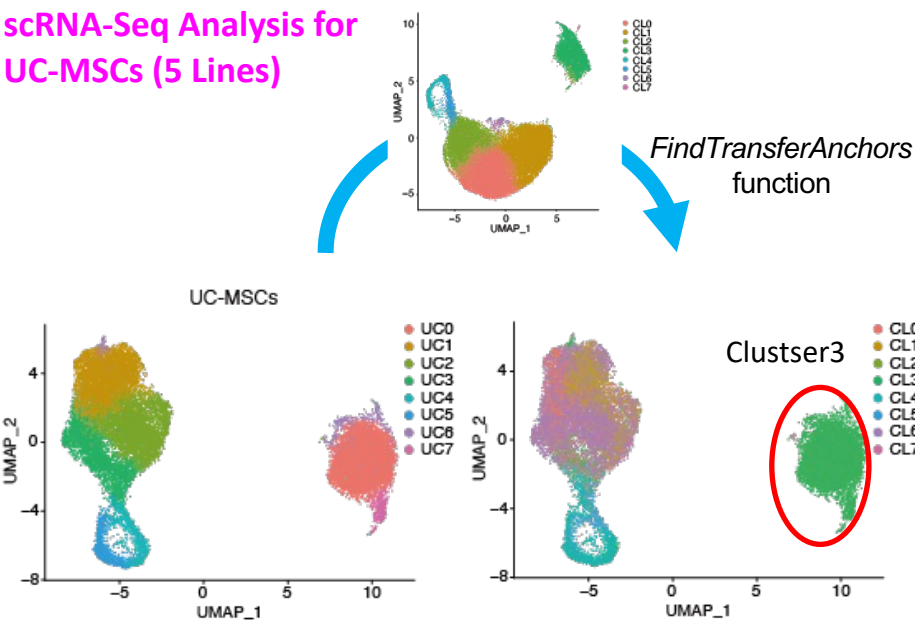
CL3で発現する *LRRC75A* は、
虚血下での *hMSC* からの VEGF の分泌を制御する

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*』

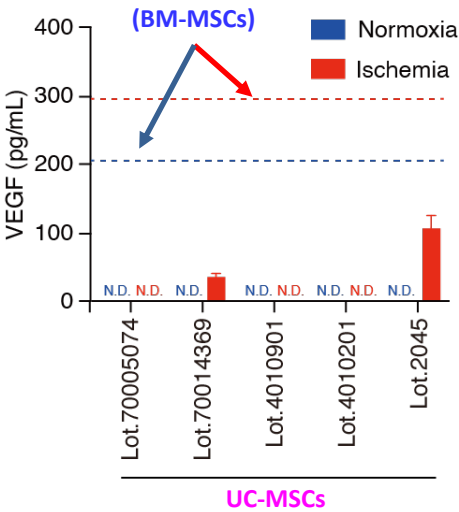


臍帯由来hMSC (UC-MSC) におけるCL3様細胞

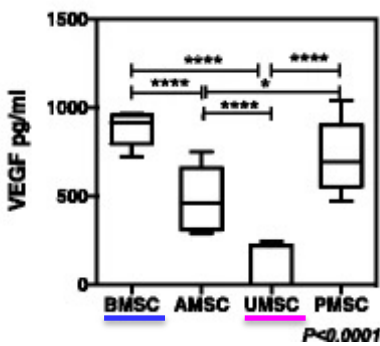
scRNA-Seq Analysis for
UC-MSCs (5 Lines)



VEGF Production
in Each Line
(Normoxia/Ischemia)



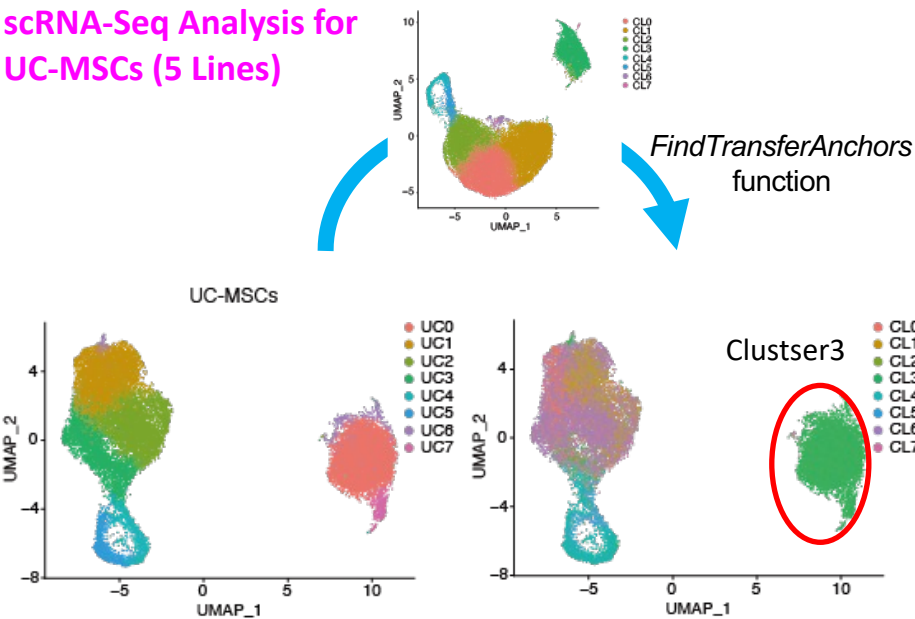
Data from
Another Group
(Normoxia)



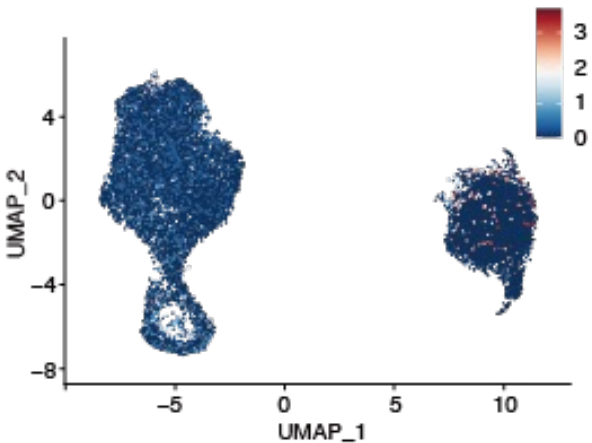
Du WJ, *et al.* *Stem Cell
Res Ther.* 2016;7:163.

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）

VERY LIKELY
TO BE TRUE!!

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

VERY LIKELY TO BE TRUE!!

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

脂肪組織由来
hMSC 4 ロット

臍帯由来 *hMSC*
5 ロット

研究で使った
特定ロットの *hMSC*
(= 特定の検体)

CONSISTENT

CONSISTENT

CONSISTENT

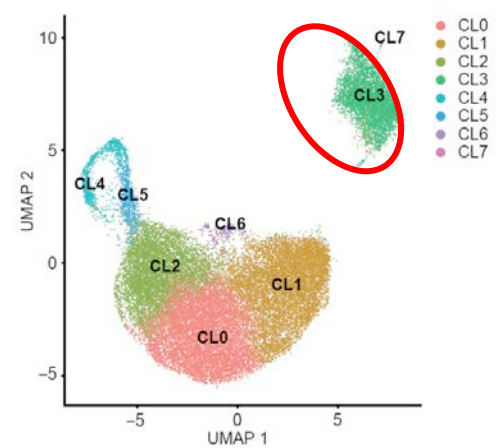
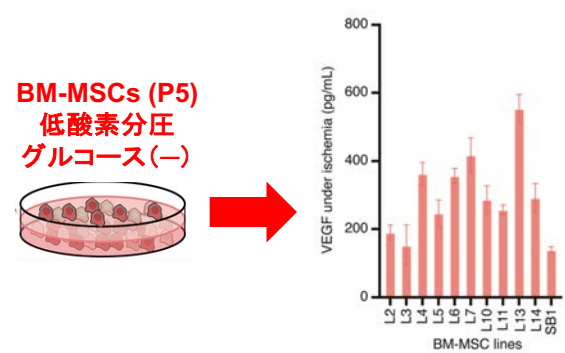
↑
テストセット

↑
トレーニングセット



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

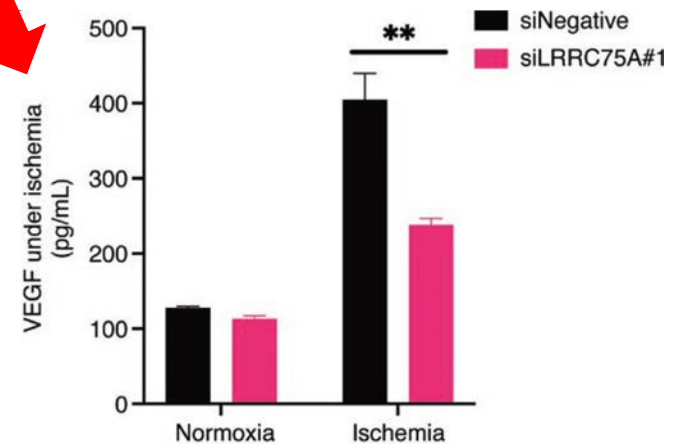
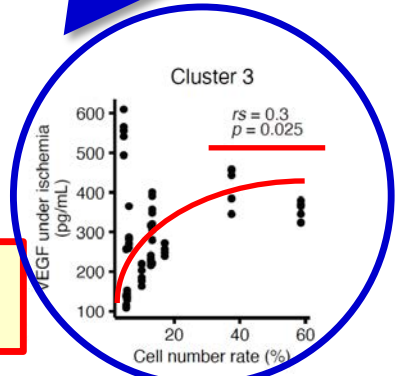


CL3で発現上昇している遺伝子
トップ20

Gene name	Ave log ₂ 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



細胞加工製品の代表的な特性

最終製品のロット間や

原料／中間製品のロット間の

品質のばらつき

「製品／原料の不均質性」

最終製品中の個々の細胞の間や

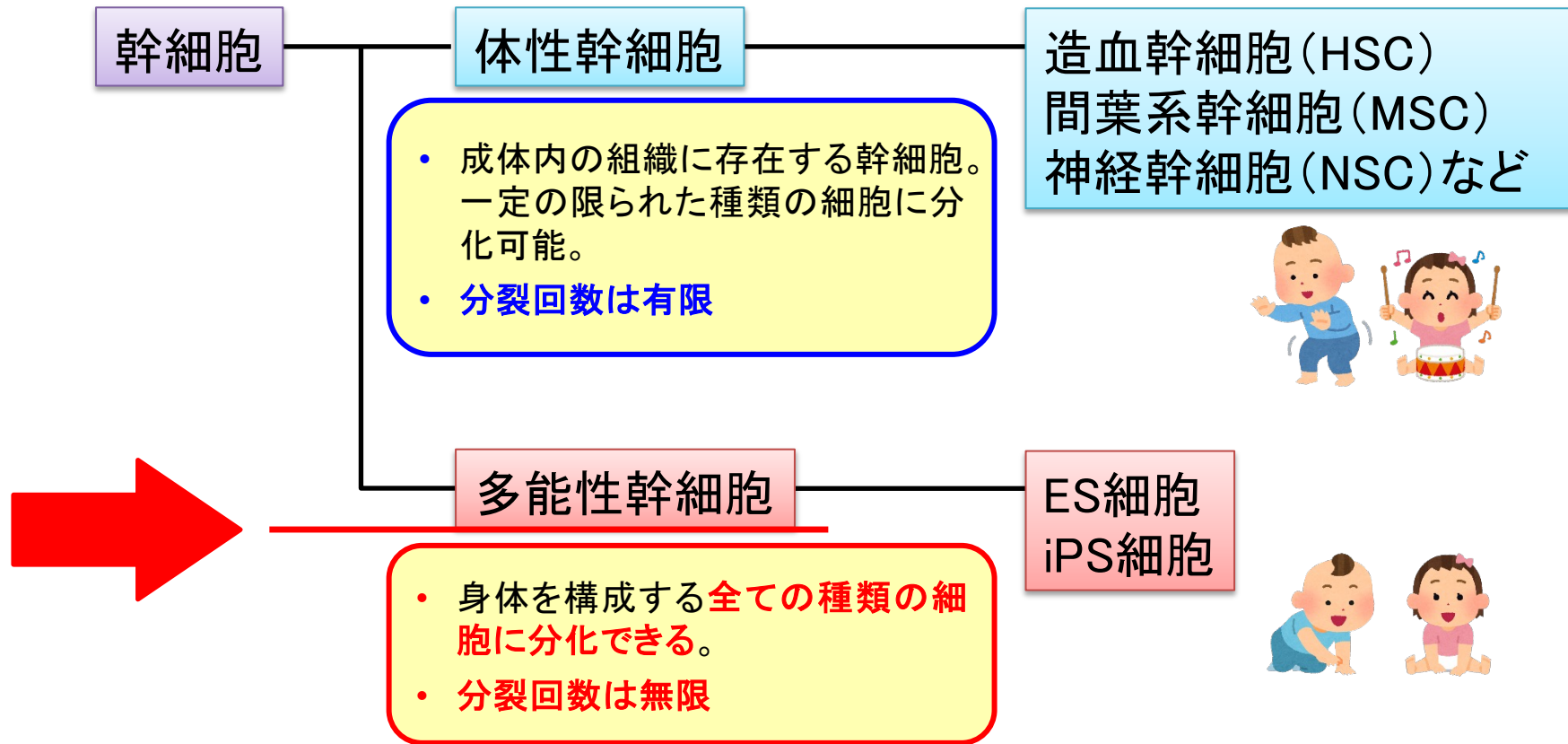
原料／中間製品中の

個々の細胞の間の形質のばらつき

「細胞集団の不均一性」



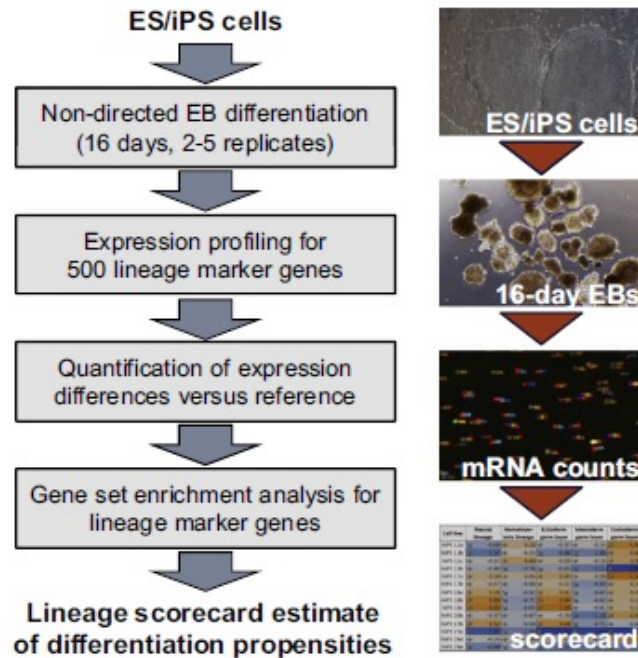
再生医療・細胞治療と「幹細胞」



「原料として優れたES/iPS細胞」とは？

例) ヒト多能性幹細胞株間における各種細胞への分化傾向(propensity)の差

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

↑ ⇒ ⇐ ↓

「多能性」は確かにあるが、株間で「分化傾向」がさまざま

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

「生きた素材」を使った「ものづくり」

ウイスキー酵母



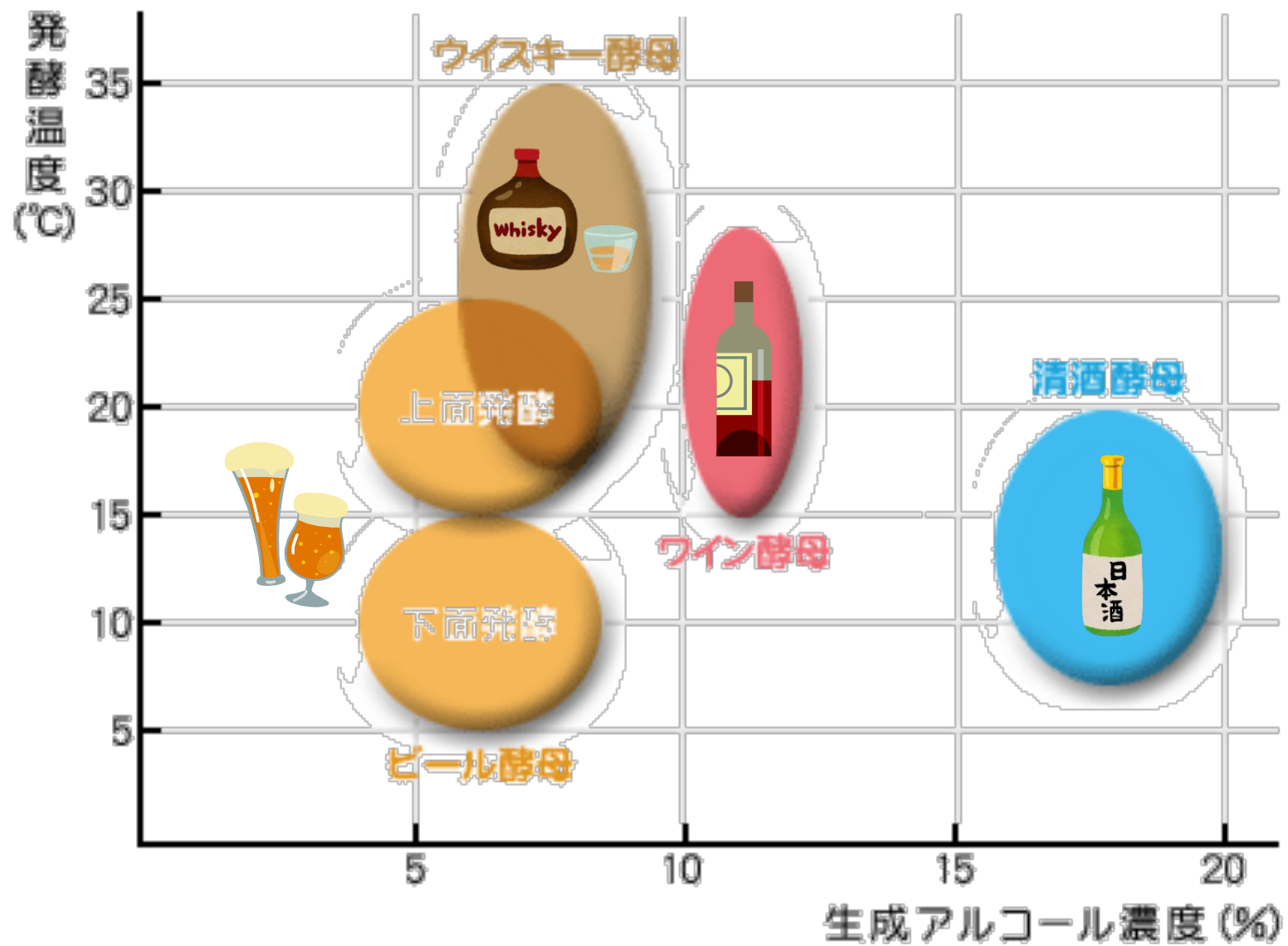
ビール酵母

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」



「生きた素材」を使った「ものづくり」

ウイスキー酵母



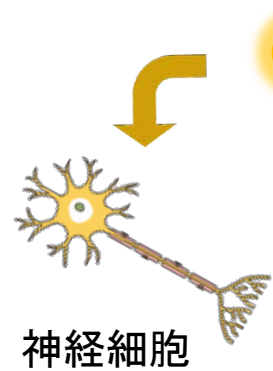
ビール酵母

ワイン酵母

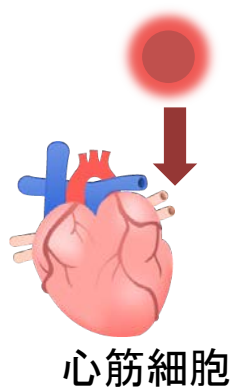


清酒酵母

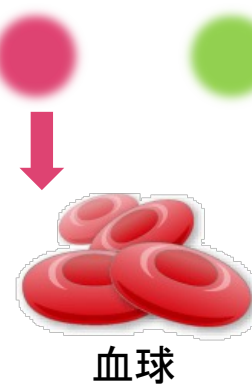
目的に合った酵母(素材)を使い分けることで、各品目で美味しい(高品質な)製品を作ります
「素材へのこだわり」「至高の素材」「厳選素材」「選び抜かれた素材」



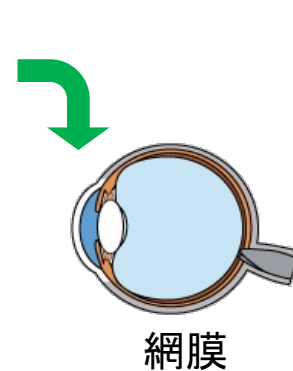
神経細胞



心筋細胞



血球



網膜

「選択性」の正体の研究

「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**を選択する(**囲い込む**)ことが重要

では、どうしたら「良い素材」を選ぶことができるのか？

品質特性指標 バイオマーカー

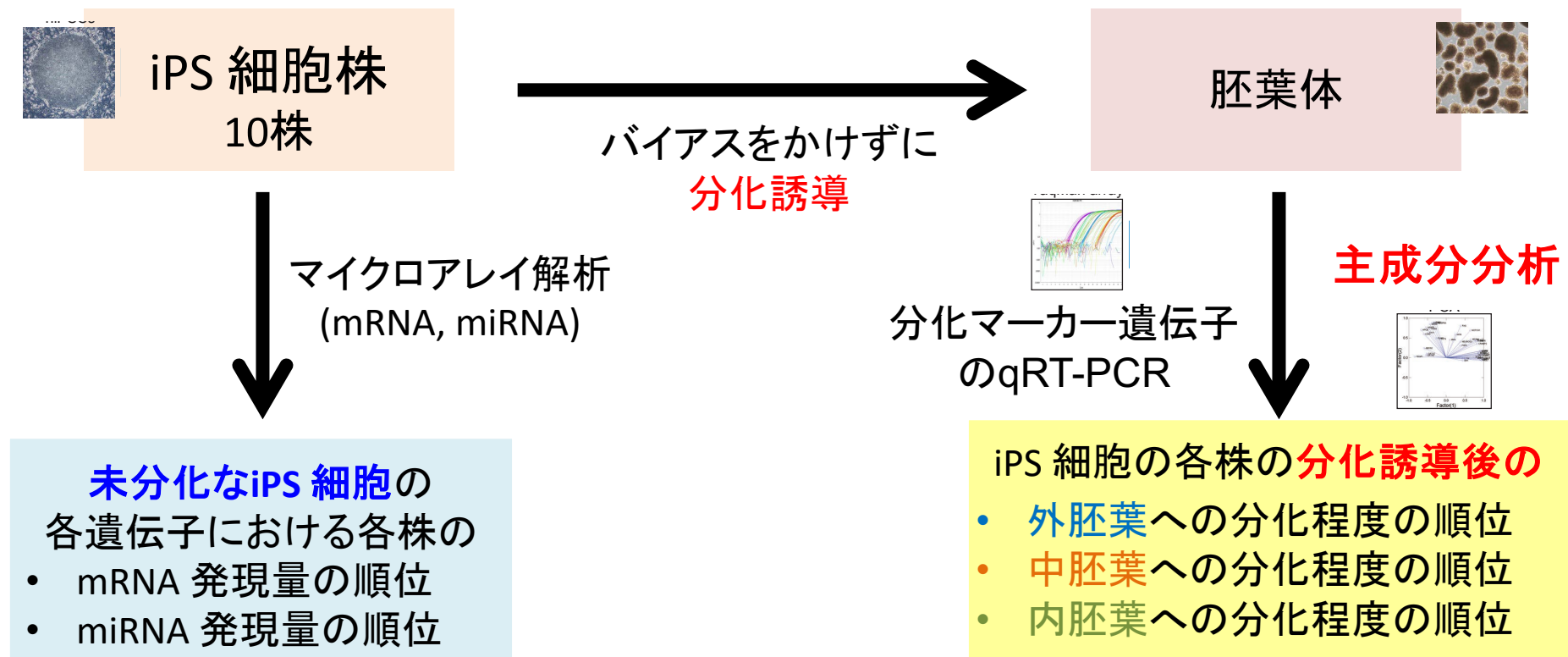
医薬品製造分野で言う「重要物質特性」
(重要原料特性, CMA: Critical Material Attribute)

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、
重要な原料の特性として原料の規格設定に利用

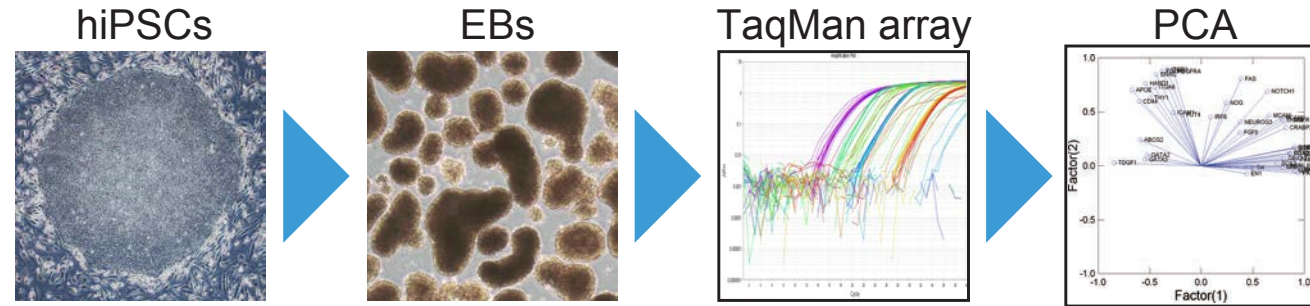
「選択性」の正体
の研究

特性指標となる因子の効率的な探索・検証の手法の開発

iPS細胞分化傾向マーカーの探索



iPS細胞は株間で分化のしやすさ（分化傾向）に 大きなバラツキがある

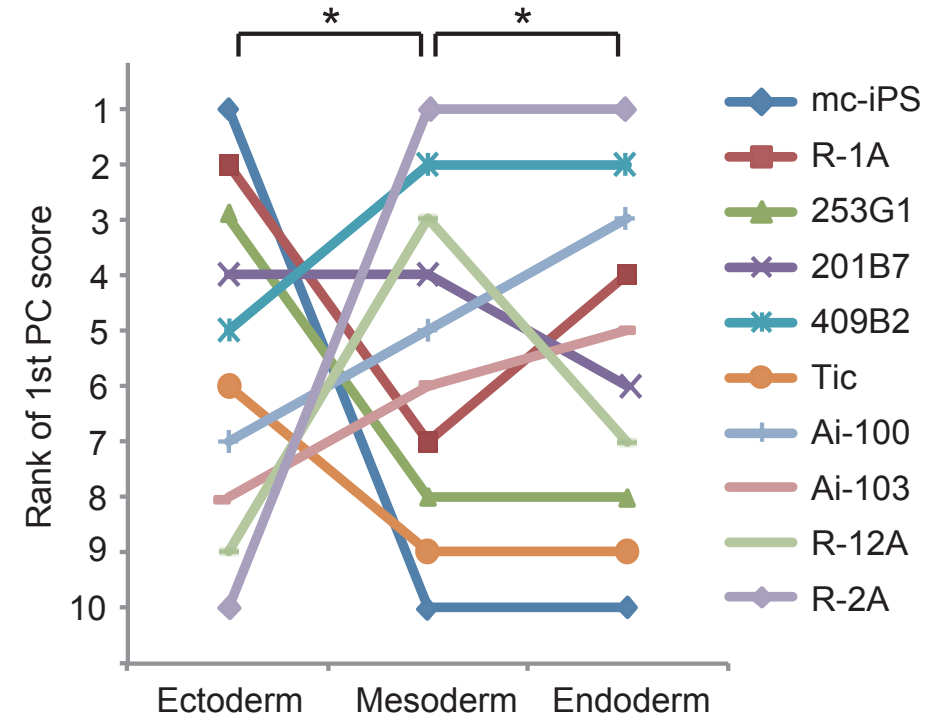


外胚葉マーカー:45遺伝子 中胚葉マーカー:56遺伝子 内胚葉マーカー:27遺伝子

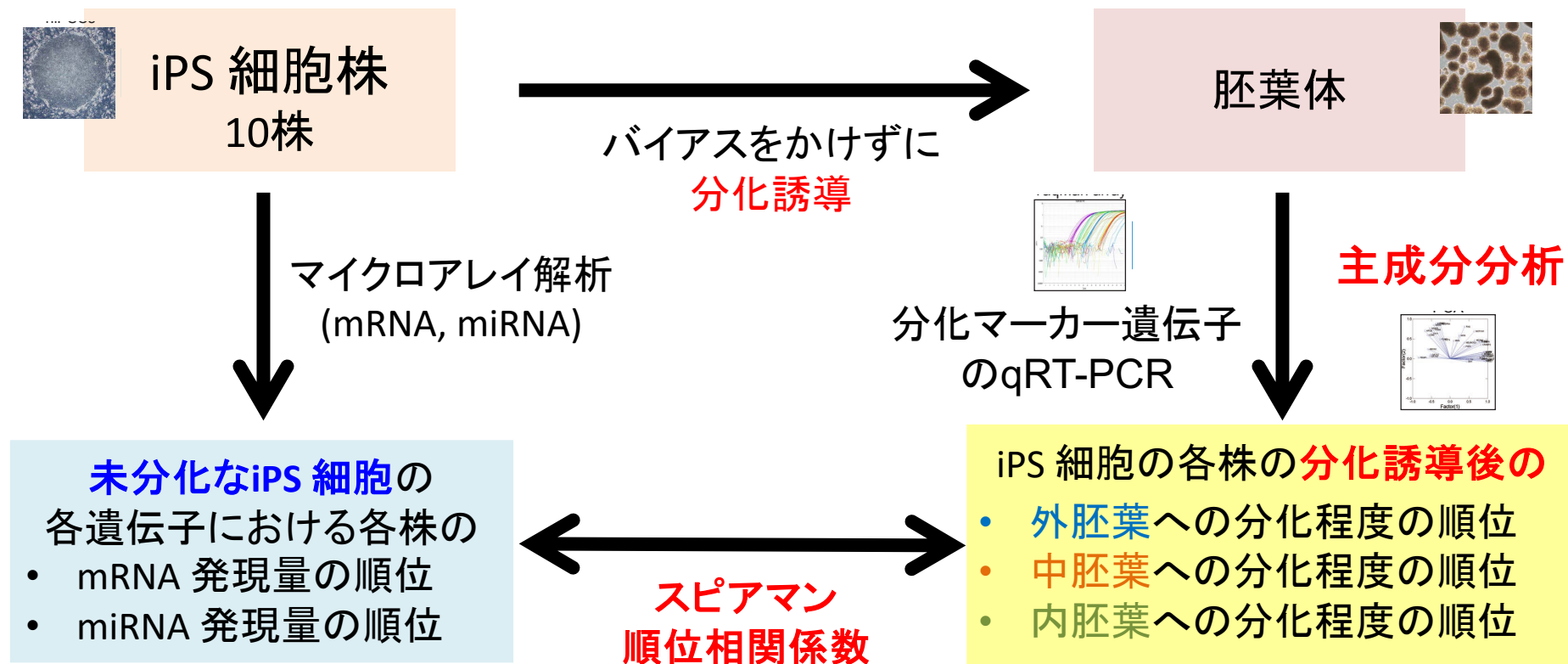
第一主成分得点

Cell line	Differentiation lineage		
	Ectoderm	Mesoderm	Endoderm
201B7	23.5	1.5	1.2
253G1	23.8	-12.6	-9.5
409B2	-11.8	18.5	9.3
Ai-100	-17.7	0.9	5.6
Ai-103	-18.0	0.2	3.0
mc-iPS	28.5	-32.2	-18.1
R-1A	25.4	-2.5	4.4
R-2A	-20.3	41.1	18.4
R-12A	-19.1	12.1	-0.4
Tic	-14.3	-27.0	-13.8

■ High □ Medium ■ Low



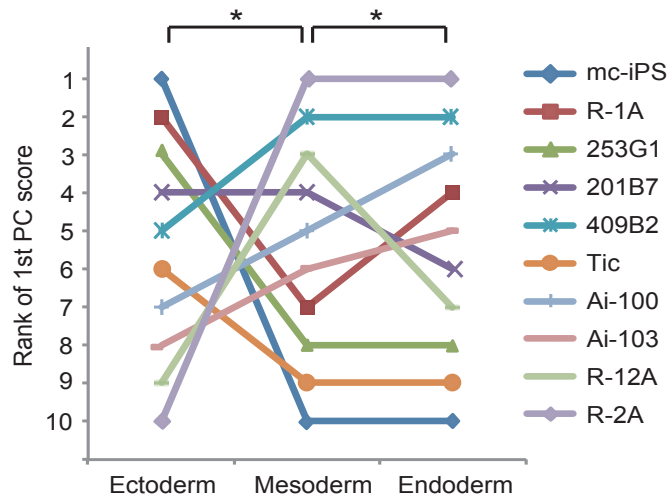
iPS細胞分化傾向マーカーの探索



Probe sets exhibiting statistically significant ($P < 0.05$)

Ectoderm			Mesoderm			Endoderm		
Correlation	MicroArray (Probes)	miRNA Array (Probes)	Correlation	MicroArray (Probes)	miRNA Array (Probes)	Correlation	MicroArray (Probes)	miRNA Array (Probes)
Positive	136	3	Positive	35	12	Positive	9	23
Negative	92	3	Negative	7	1	Negative	29	0

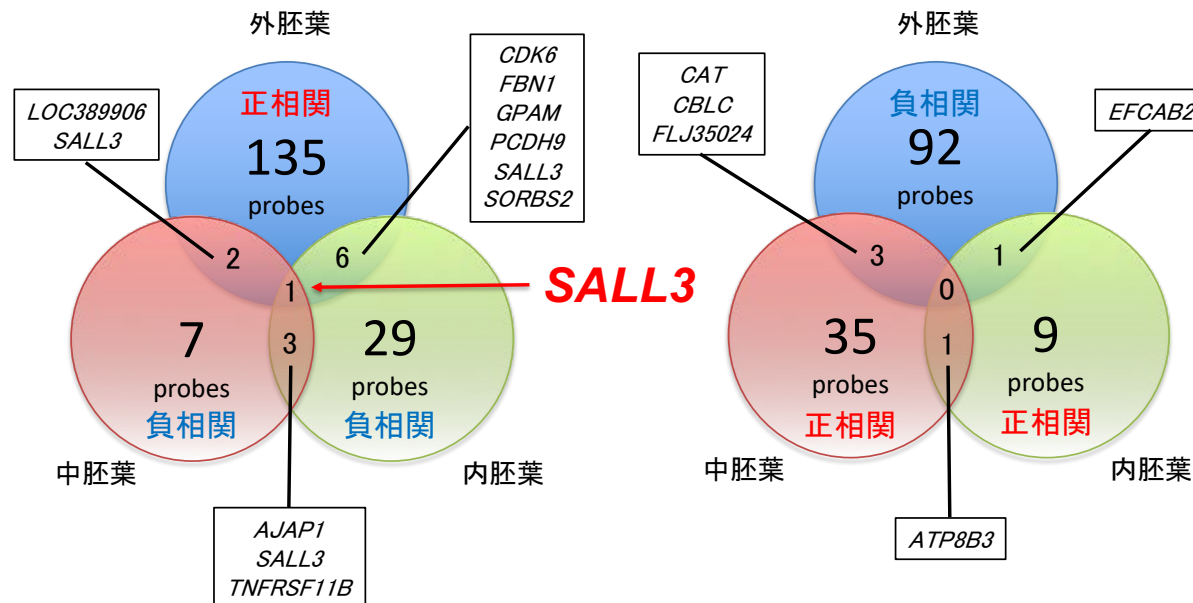
iPS細胞の分化傾向マーカー *SALL3*



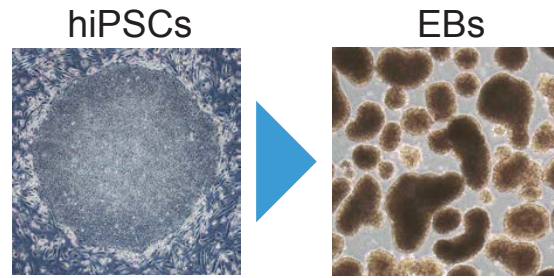
外胚葉になりやすい株は中・内胚葉になりにくい
中・内胚葉になりやすい株は外胚葉になりにくい

仮説

外胚葉 ↔ 中・内胚葉で逆相関を示す遺伝子
= 機能的に分化に関与

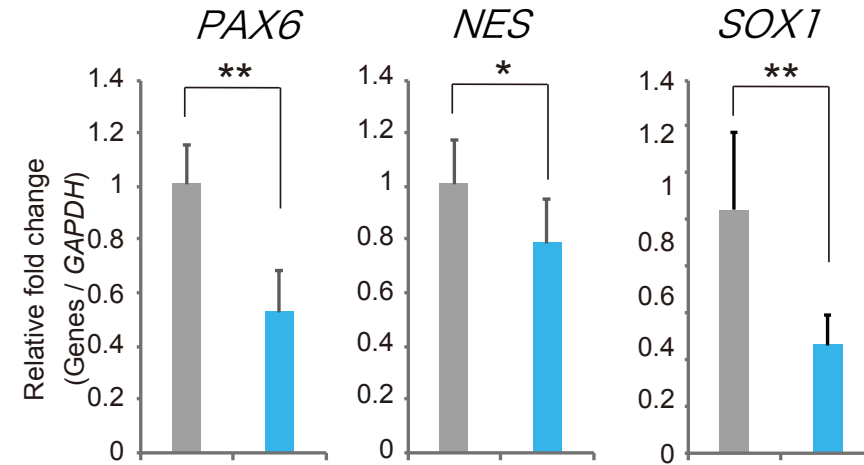


253G1 SALL3 KD株 EB分化

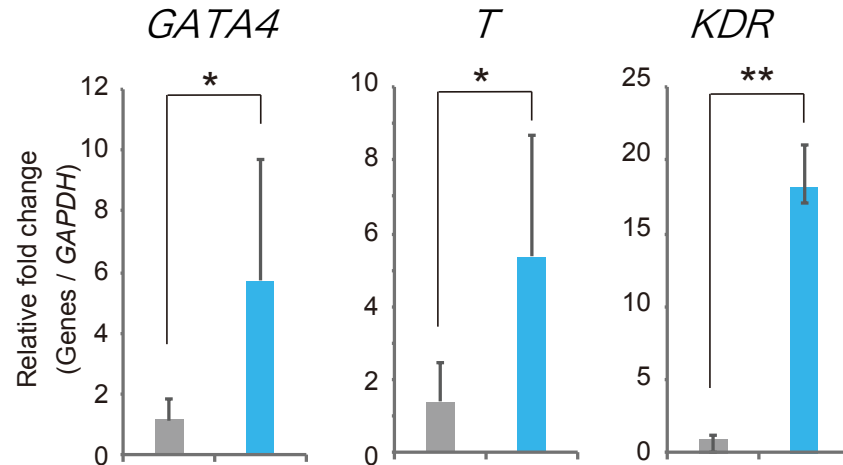


Control shRNA
SALL3 shRNA

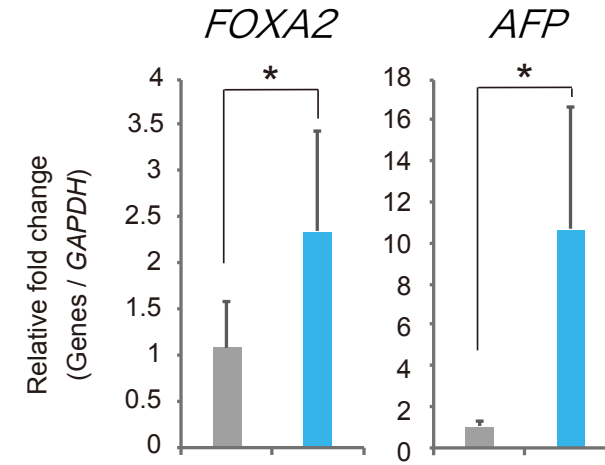
外胚葉マーカー



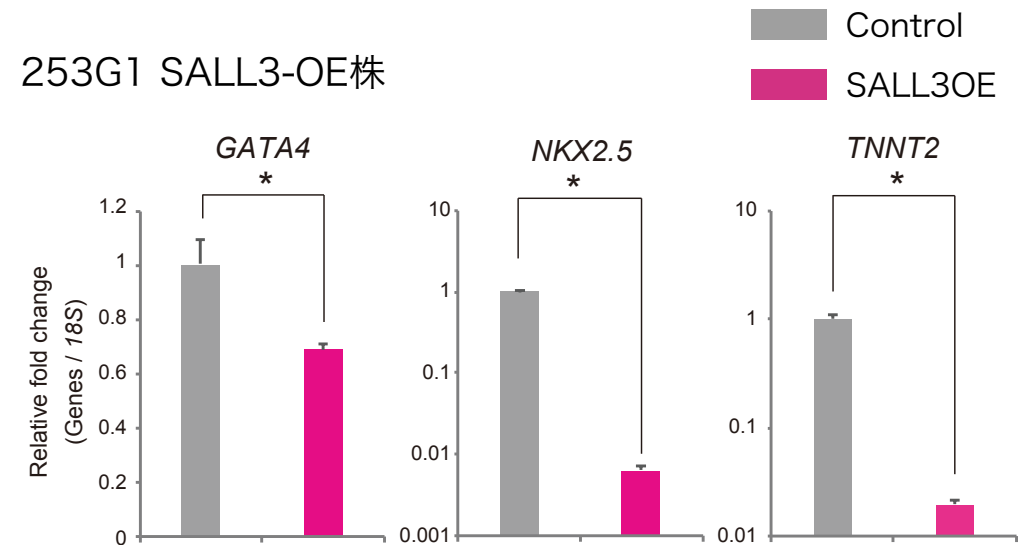
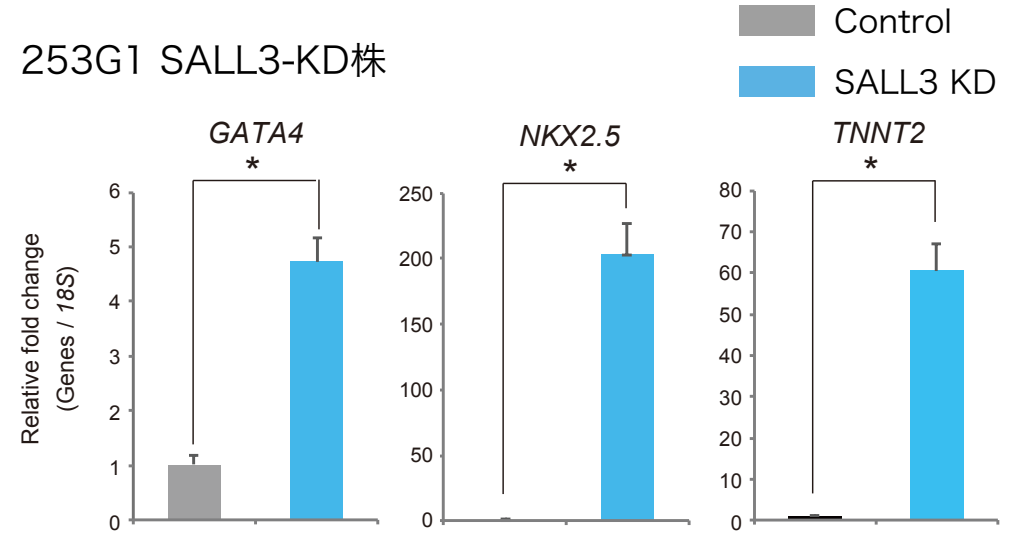
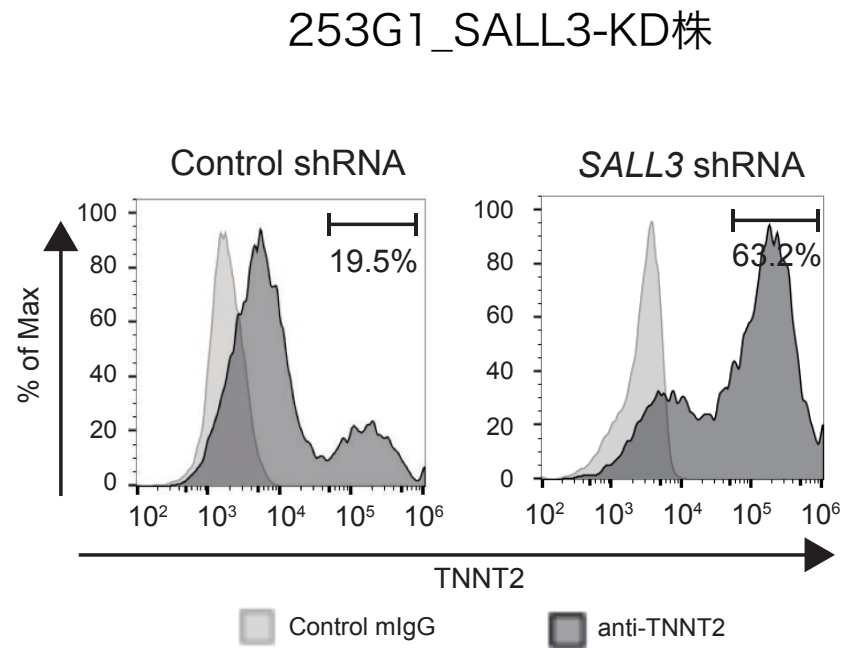
中胚葉マーカー



内胚葉マーカー



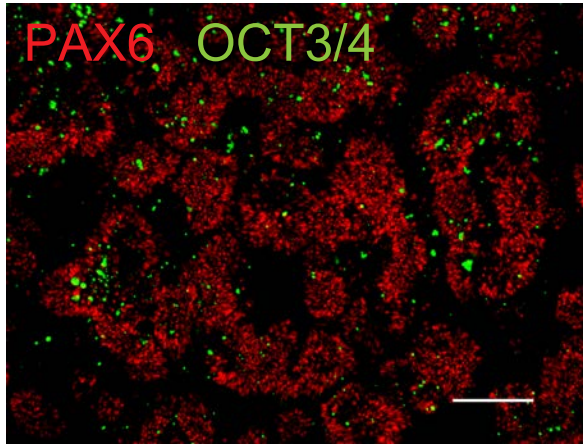
253G1 SALL3 KD/OE株 心筋分化誘導



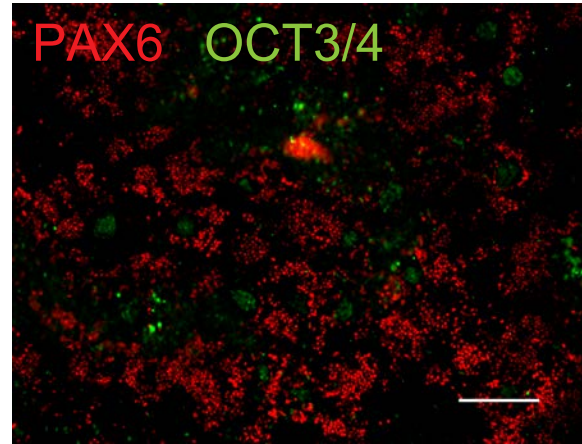
253G1 SALL3 KD/OE株 神経分化誘導

神経分化誘導 (Day10)

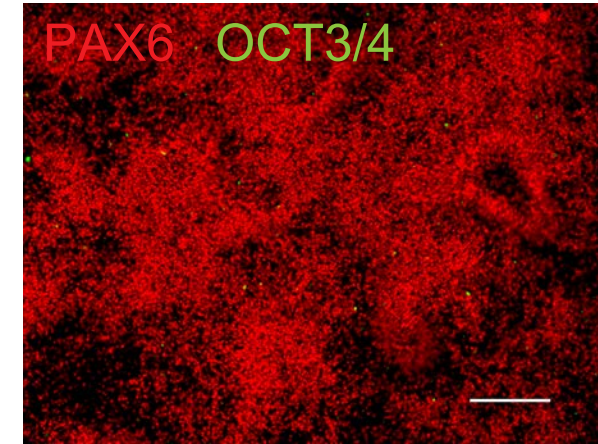
PAX6: 外胚葉マーカー



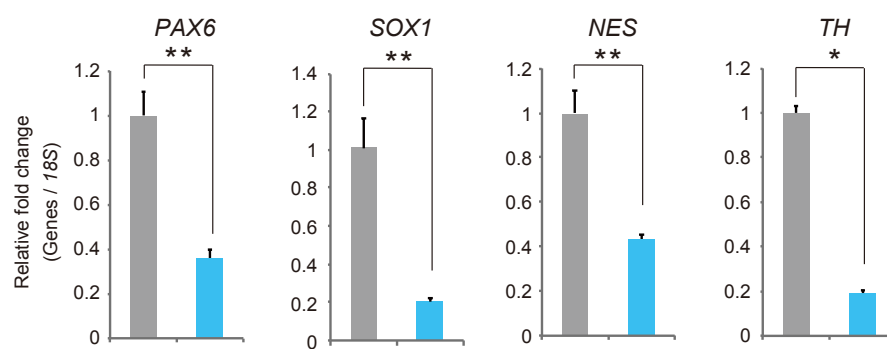
253G1



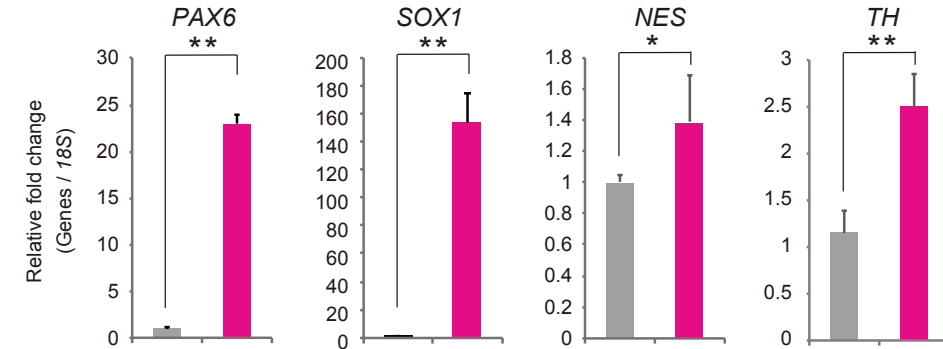
253G1_SALL3-KD



253G1_SALL3-OE



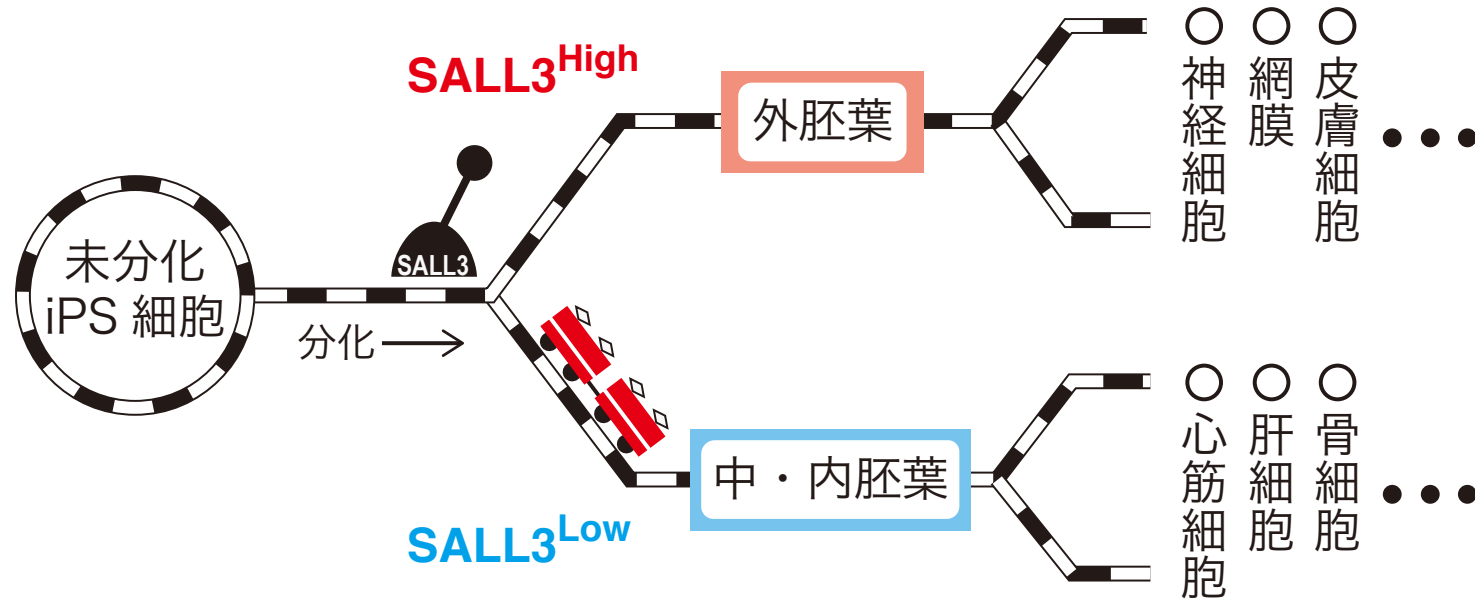
Control
SALL3 KD



Control
SALL3OE

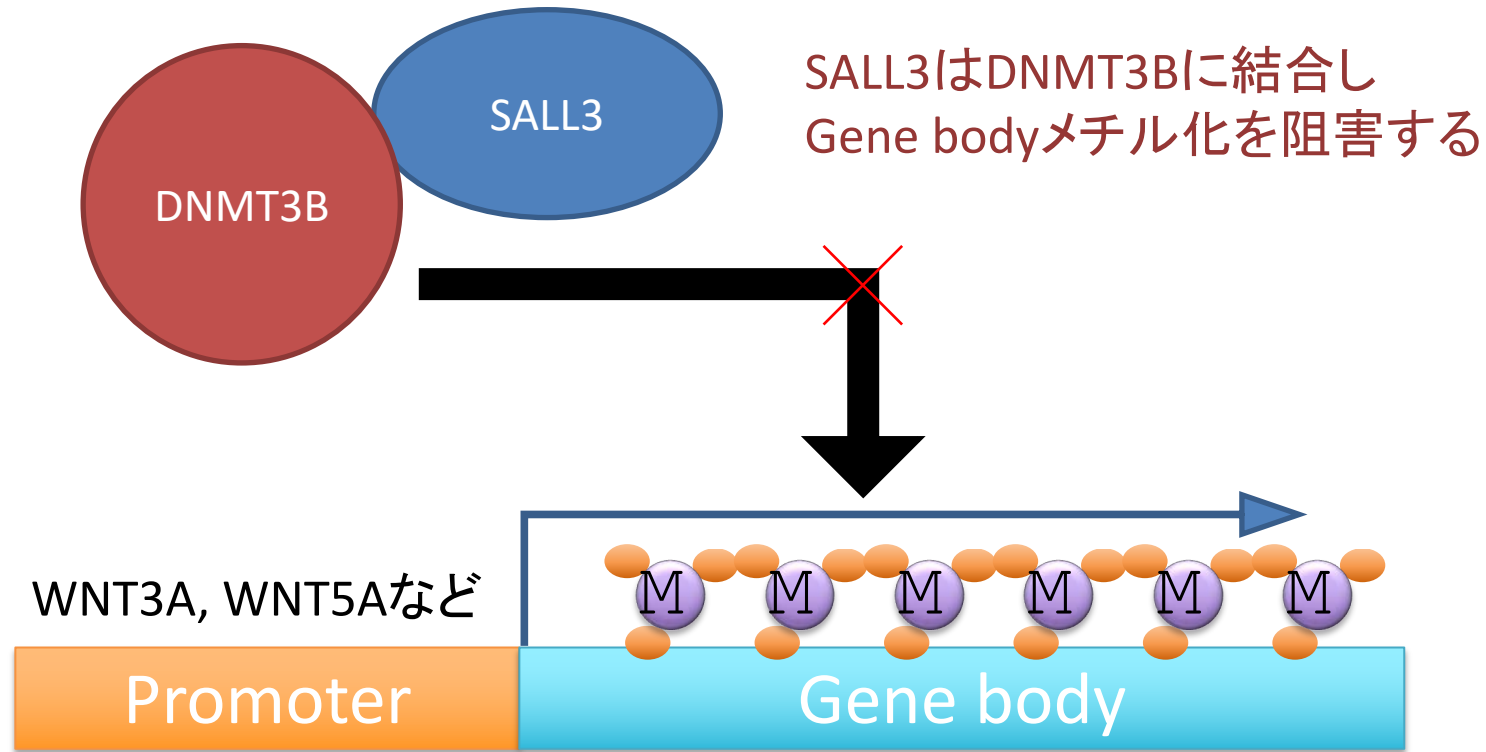
iPS細胞の分化傾向マーカー SALL3

ヒトiPS細胞はSALL3の発現が高いと外胚葉に分化しやすく、
逆に発現量が低いと中・内胚葉に分化しやすい



SALL3は分化傾向を調節する分岐器（ポイント）の機能を持つ。

SALL3の分化傾向決定のメカニズム



SALL3はDNMT3BのGene bodyメチル化を阻害している。

「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)

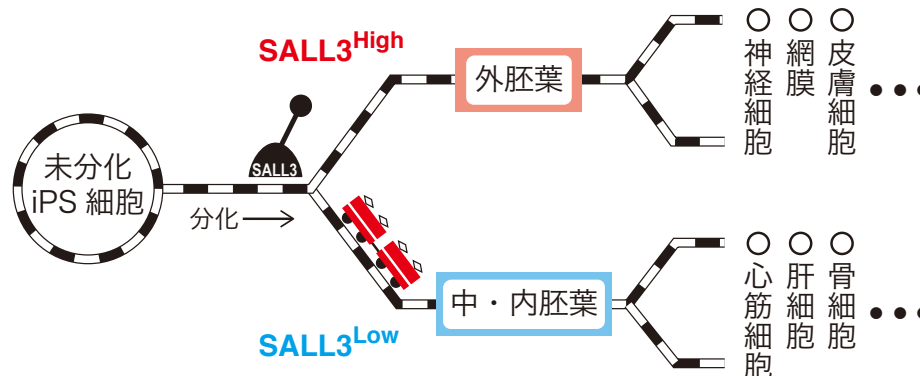
nature COMMUNICATIONS

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 Kuroda¹, Satoshi Yasuda¹, Shiori Tachi^{1,2}, Satoko Matsuyama^{1,3}, Shinji Kusakawa¹, Keiko Tano¹, Takumi Miura¹, Akifumi Matsuyama³ & Yoji Sato^{1,2,4,5}

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.



AMEDプレスリリース



国立研究開発法人 日本医療研究開発機構
Japan Agency for Medical Research and Development

MENU

プレスリリース

ヒトiPS細胞の分化傾向調節遺伝子SALL3を同定—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)を持っていますが、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



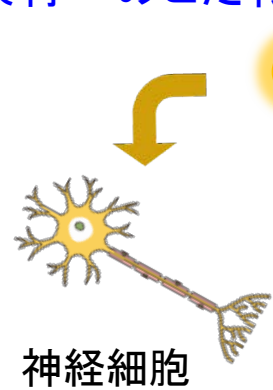
ビール酵母

ワイン酵母

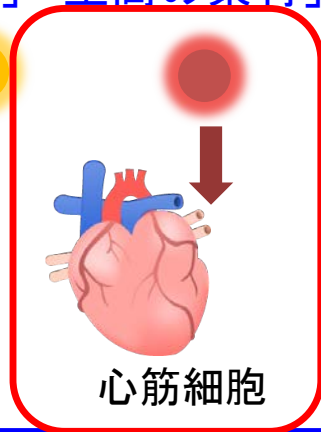


清酒酵母

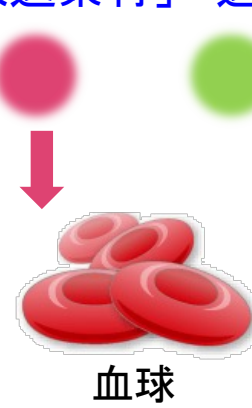
目的に合った酵母(素材)を使い分けることで、各品目で美味しい(高品質な)製品を作ります
「素材へのこだわり」「至高の素材」「厳選素材」「選び抜かれた素材」



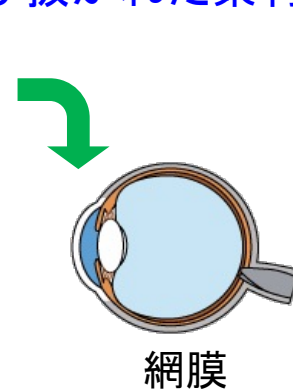
神経細胞



心筋細胞



血球



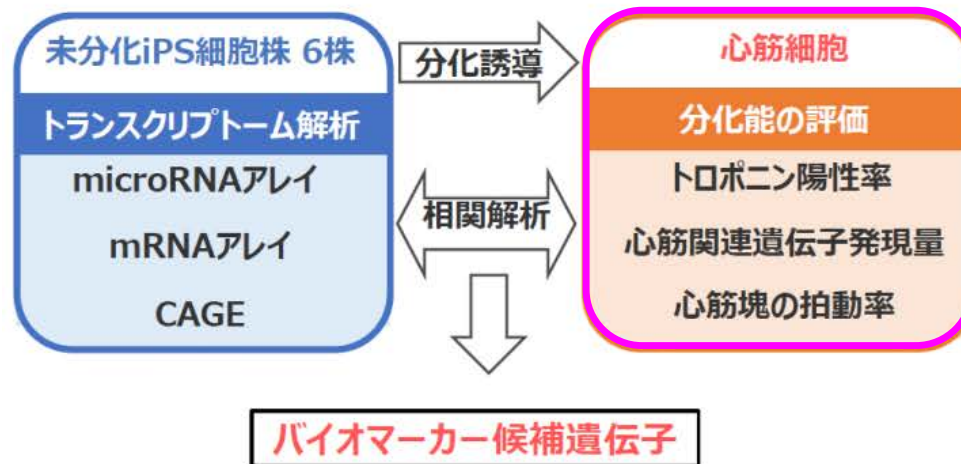
網膜

「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**を選択する(**囲い込む**)ことが重要

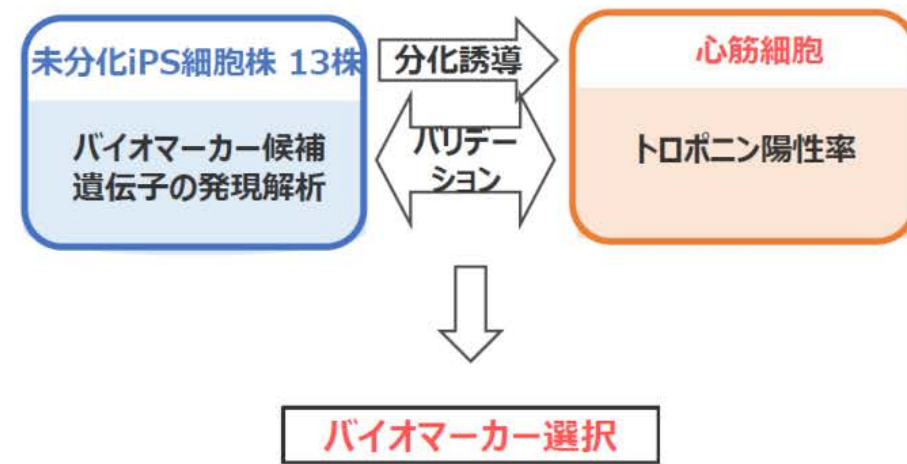
「目的細胞へのなりやすさ」を予測するための iPS細胞バイオマーカー（心筋細胞）

ストラテジー

トレーニングセット



テストセット



候補遺伝子を絞りこむ

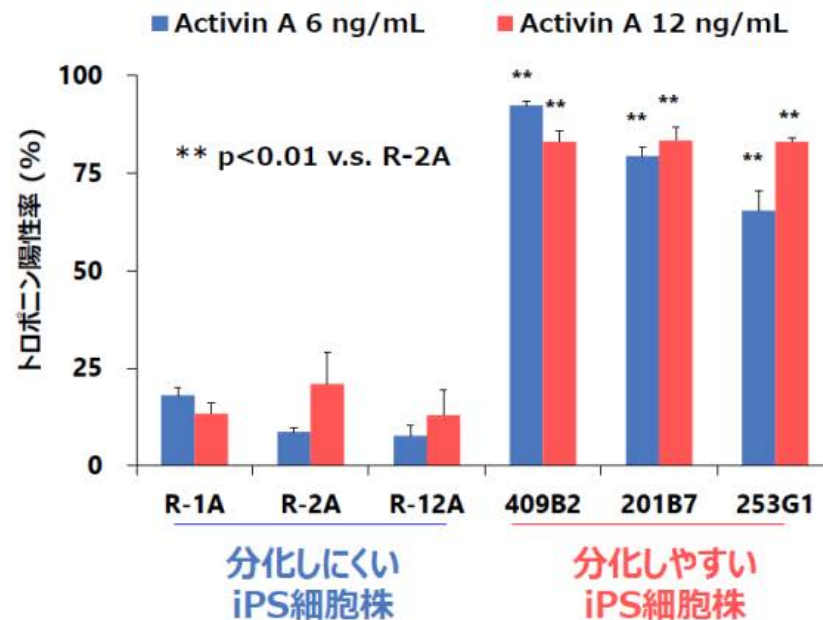


候補遺伝子のバリデーション

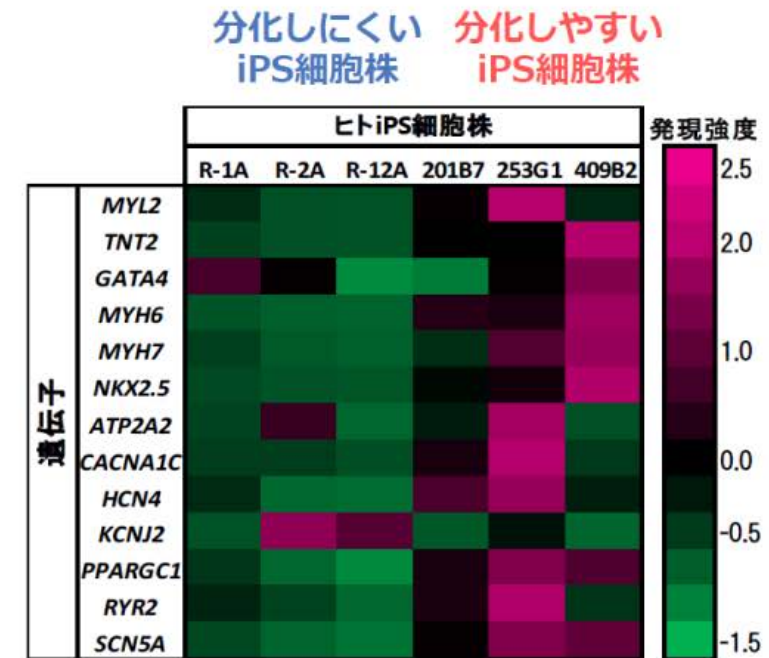
「目的細胞へのなりやすさ」を予測するための iPS細胞バイオマーカー（心筋細胞）

iPS細胞株間の心筋細胞への分化のしやすさの違い

心筋細胞のトロポニン陽性率



心筋細胞関連遺伝子の発現解析

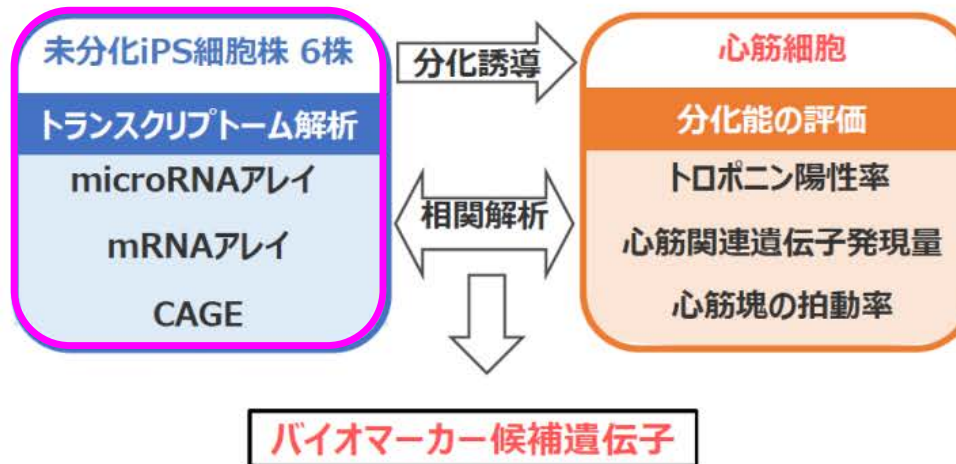


iPS細胞株による心筋分化しやすさの違いが明らかになった

「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（心筋細胞）

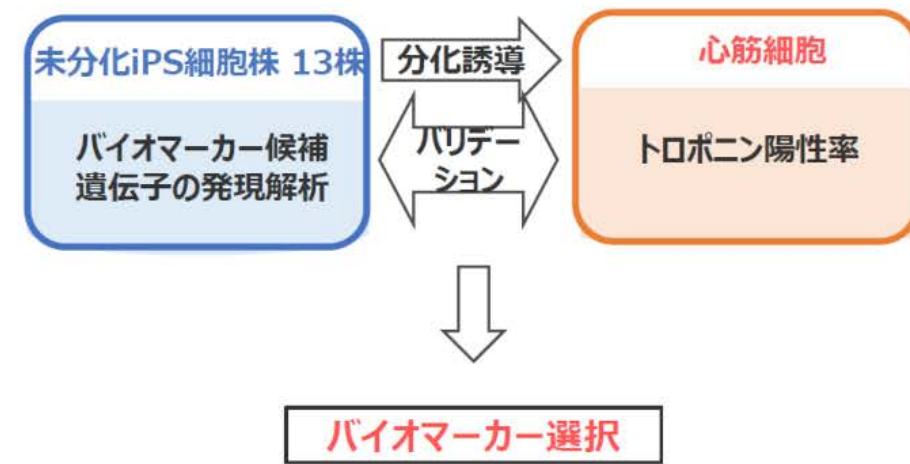
ストラテジー

トレーニングセット



候補遺伝子を絞りこむ

テストセット

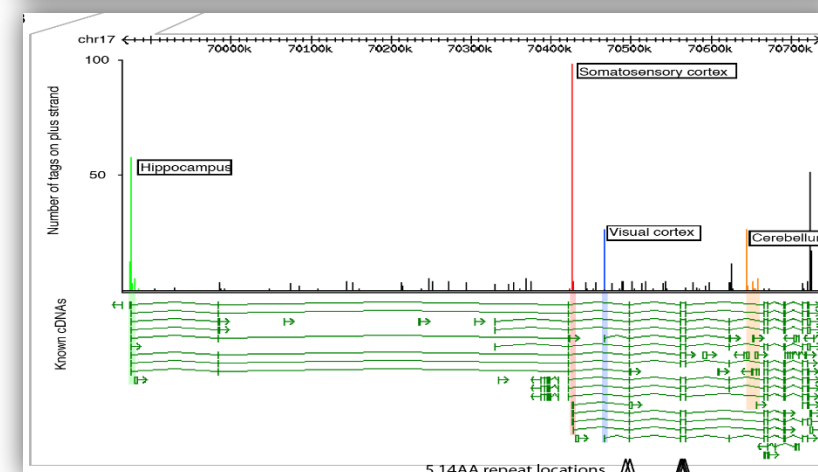
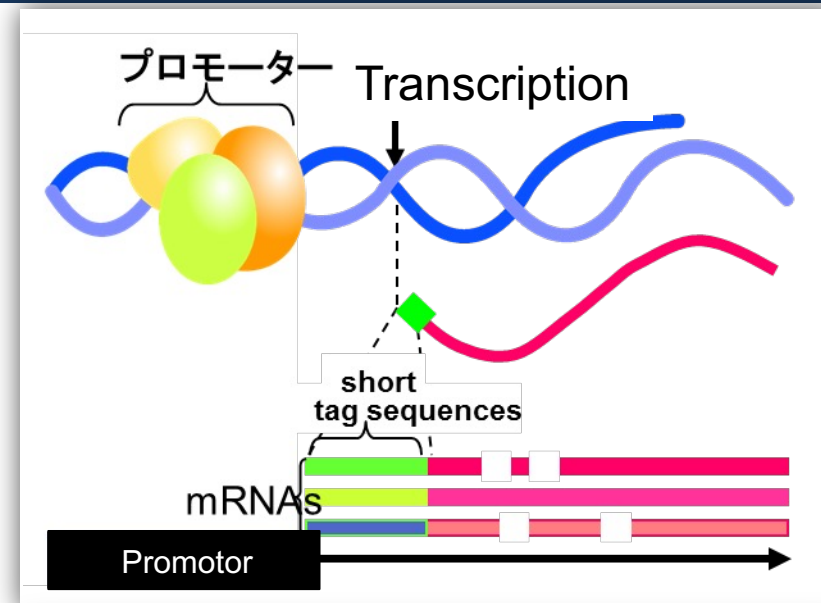
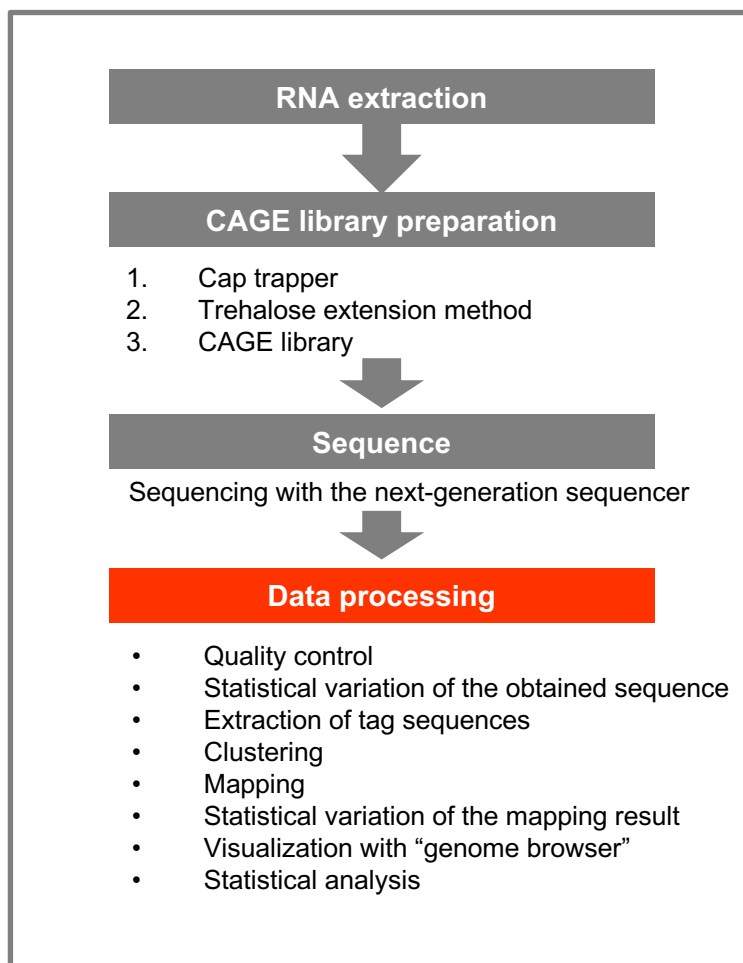


候補遺伝子のバリデーション

CAGE (Cap Analysis of Gene Expression)



耐熱性逆転写酵素やcap-trapper法を組み合わせ、転写物の5'末端から約20塩基のタグ配列を切り出し、塩基配列を決定する実験技法。

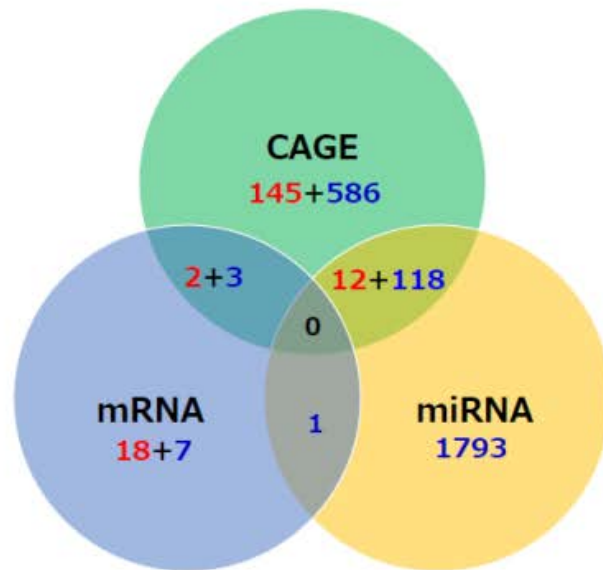


Different "transcription start point" is used for each cell type

「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）

バイオマーカー候補遺伝子の選定

3つの遺伝子解析手法の組み合わせ



バイオマーカー候補遺伝子

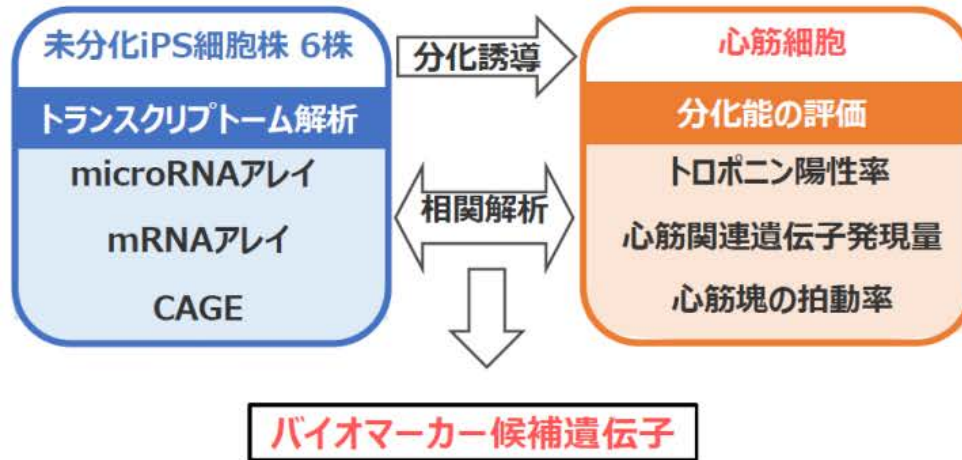
遺伝子名	解析	遺伝子名	解析
<i>CHCHD2</i>	CAGE & GeneChip	<i>ZNF229</i>	CAGE & GeneChip
<i>CXCL4 / PF4</i>	CAGE & GeneChip	<i>PLCB1</i>	GeneChip
<i>KDM6A</i>	GeneChip	<i>TMEM64</i>	CAGE & miRNA
<i>BCOR</i>	GeneChip	<i>PTGR1</i>	CAGE
<i>POMZP3</i>	GeneChip	<i>FOXQ1</i>	CAGE
<i>RBMX</i>	GeneChip	<i>MYL4</i>	CAGE
<i>RC3H1</i>	GeneChip	<i>FGF17</i>	CAGE & miRNA
<i>GLIPR1</i>	GeneChip	<i>GATA6</i>	CAGE & miRNA
<i>RIPK1</i>	CAGE	<i>ANKRD1</i>	CAGE & miRNA
<i>C7orf50</i>	CAGE	<i>IGFBP5</i>	CAGE & miRNA
		<i>WNT3</i>	CAGE
		<i>IGF2</i>	CAGE

遺伝子解析手法を組み合わせることでバイオマーカー候補遺伝子を22個に絞り込むことができた

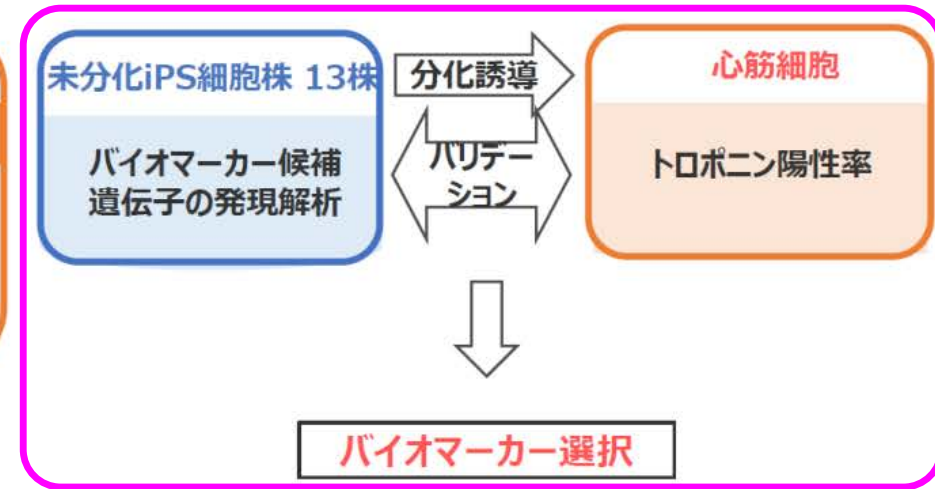
「目的細胞へのなりやすさ」を予測するための iPS細胞バイオマーカー（心筋細胞）

ストラテジー

トレーニングセット



テストセット



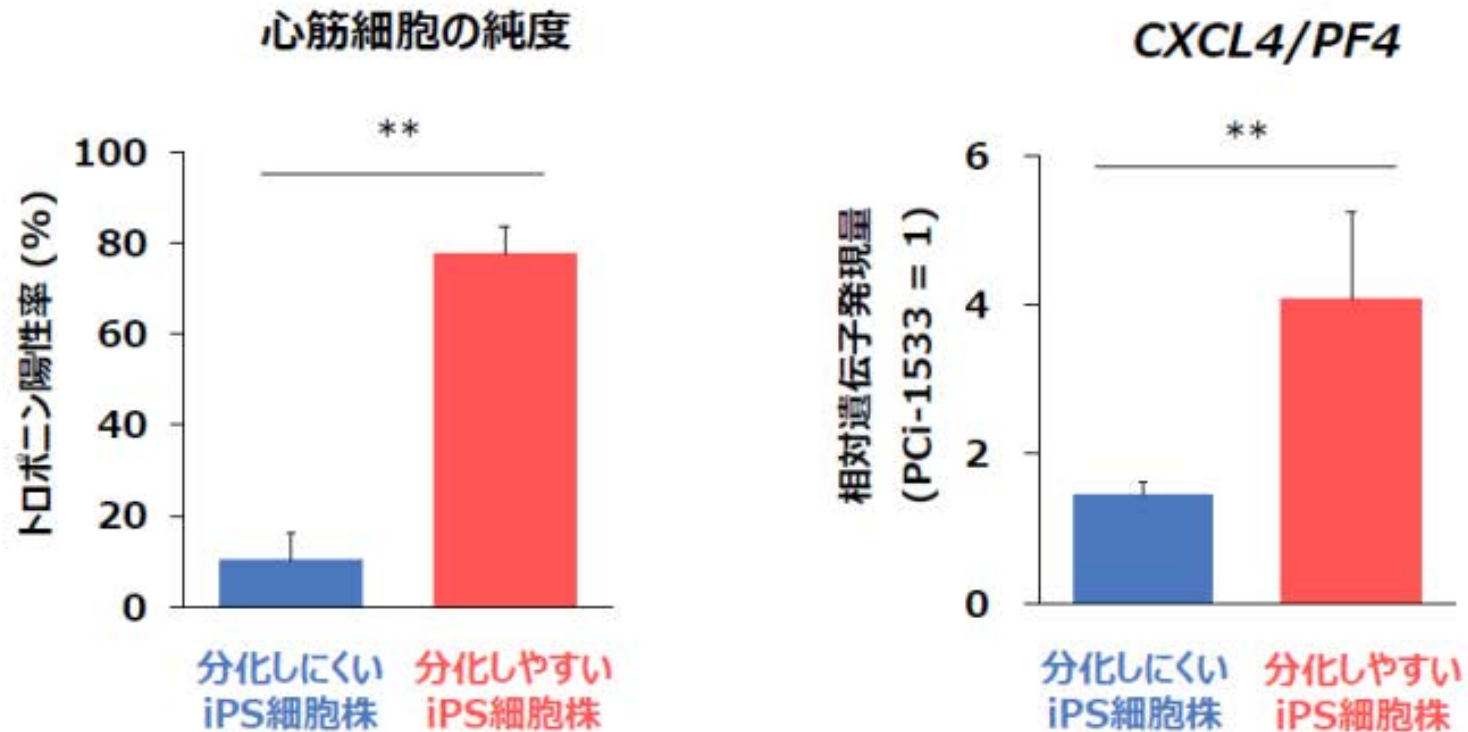
候補遺伝子を絞りこむ



候補遺伝子のバリデーション

「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**）

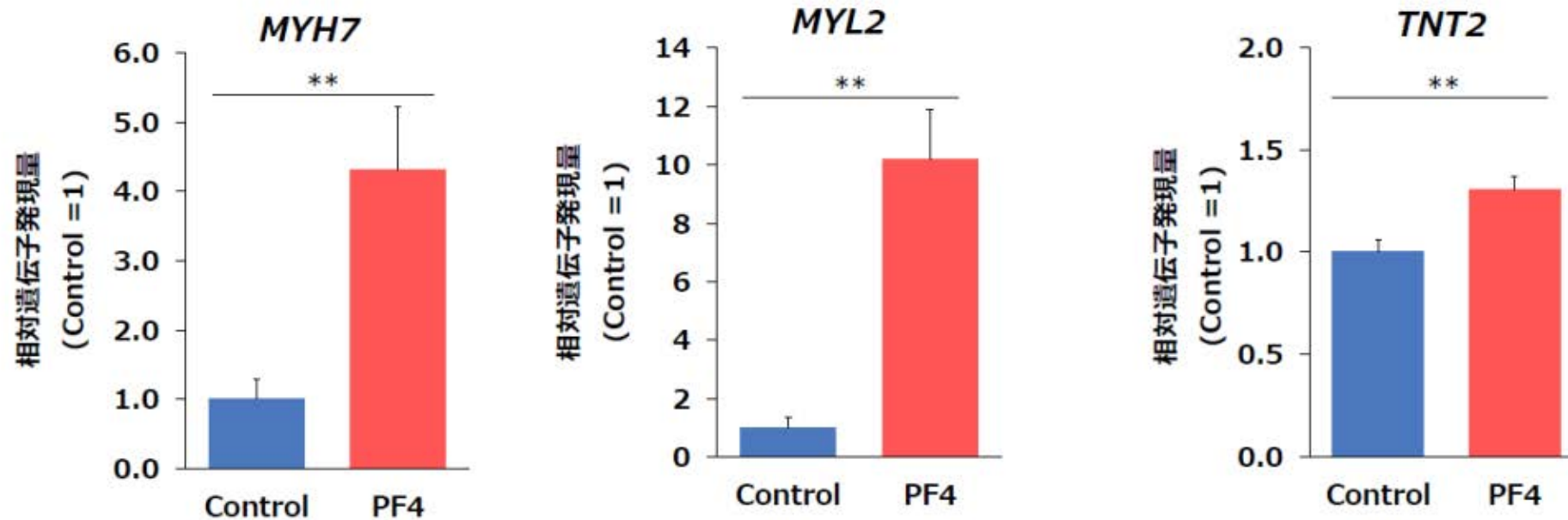
テストセット(13株)でのバイオマーカー候補遺伝子のバリデーション



テストセットにおいても心筋分化能と発現に相関のある遺伝子 **CXCL4/PF4** を同定

「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**）

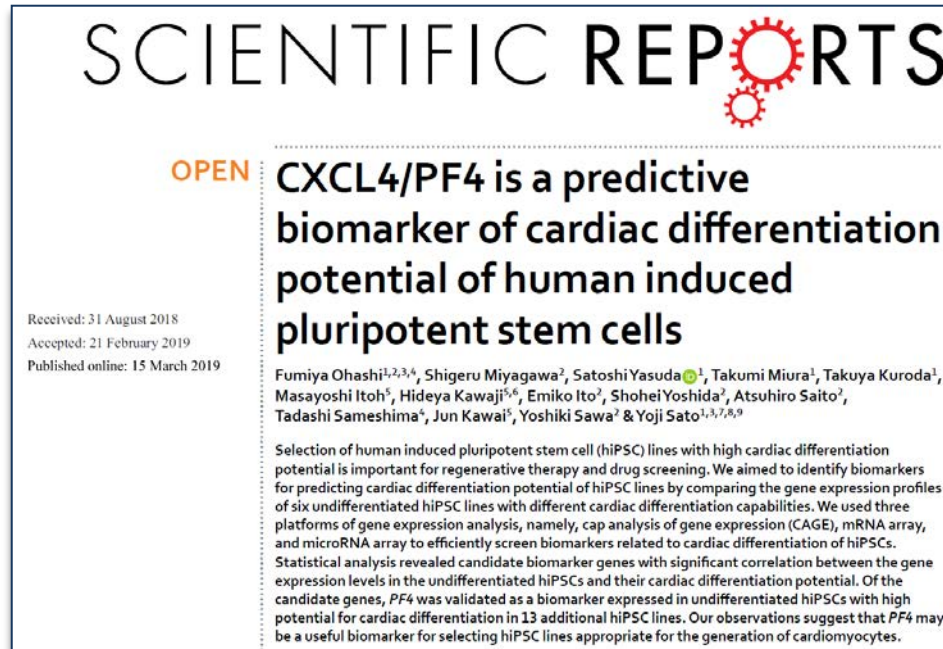
PF4タンパク質での前処理による心筋細胞分化促進作用



iPS細胞をPF4を含む培地で前処理すると、**心筋細胞関連遺伝子の発現が高くなる**
＝**相関のみならず、心筋分化における機能的な関与を示唆**

「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



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

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

◀ 前の記事 | 1 一覧へ戻る | ▶ 次の記事

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村樹教授、宮川繁特任教授、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。

「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

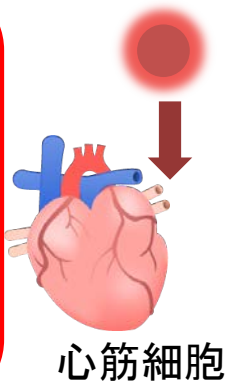


清酒酵母

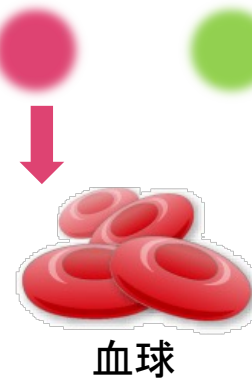
目的に合った酵母(素材)を使い分けることで、各品目で美味しい(高品質な)製品を作ります
「素材へのこだわり」「至高の素材」「厳選素材」「選び抜かれた素材」



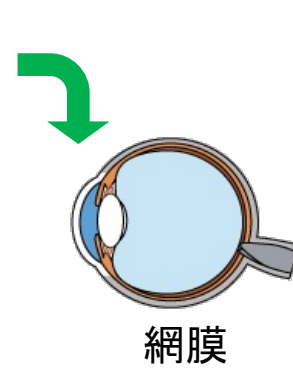
神経細胞



心筋細胞



血球

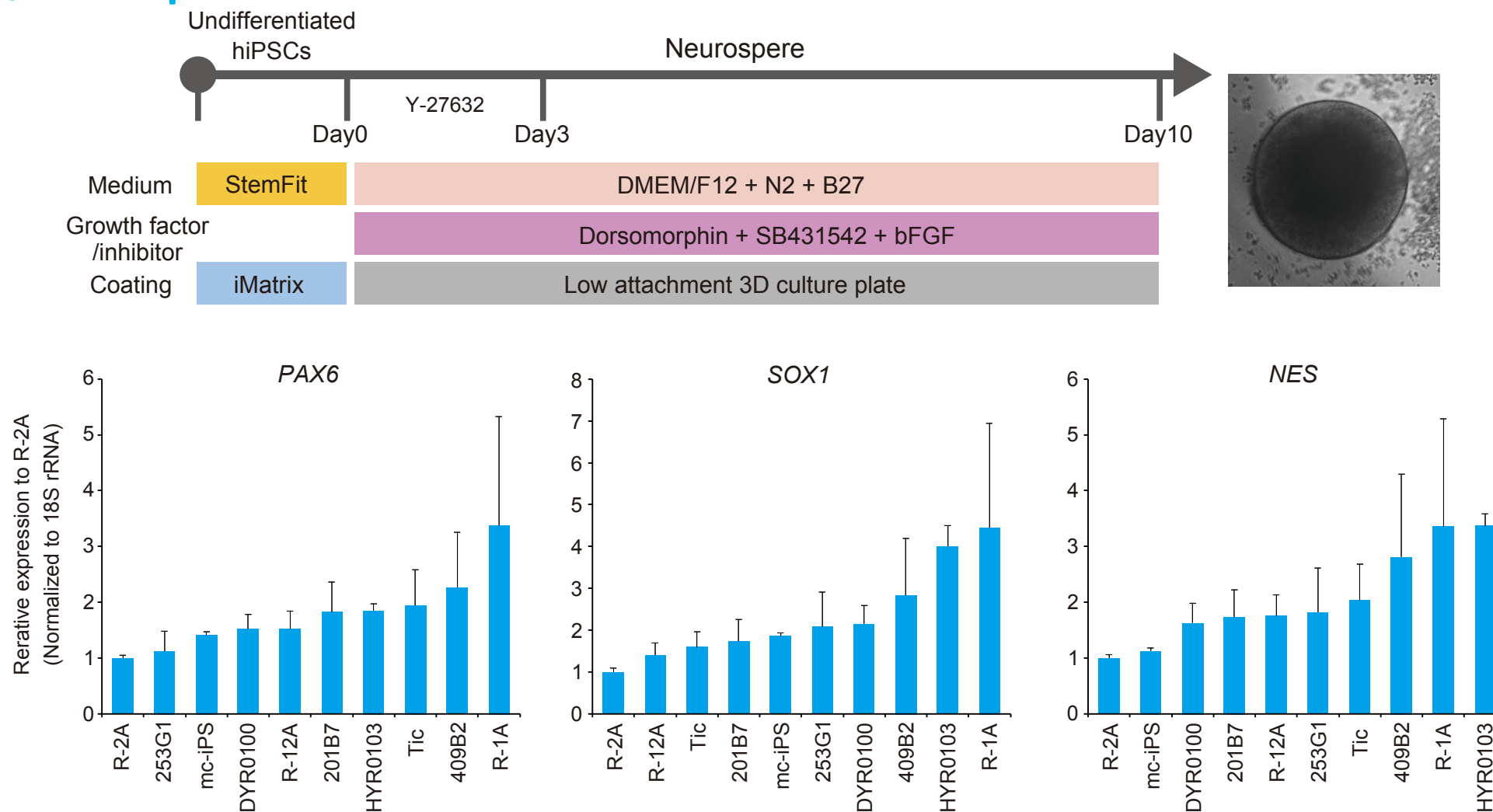


網膜

「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**を選択する(**囲い込む**)ことが重要

10株のhiPSC株の神経幹／前駆細胞(NS/PC)への分化傾向の解析(浮遊培養法)

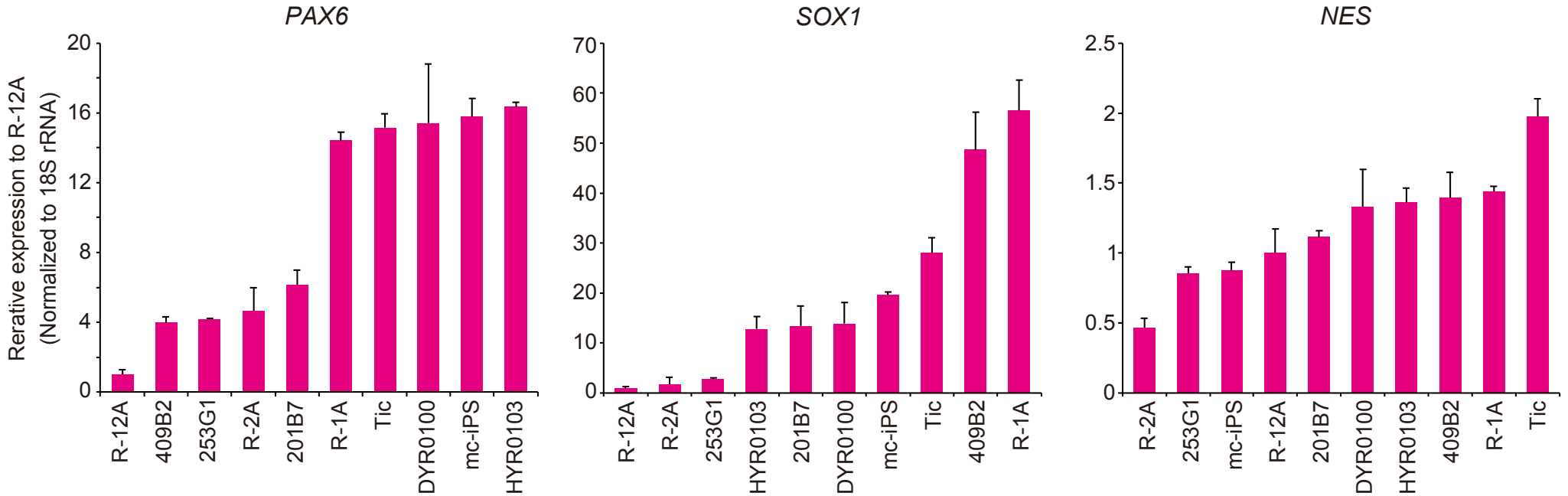
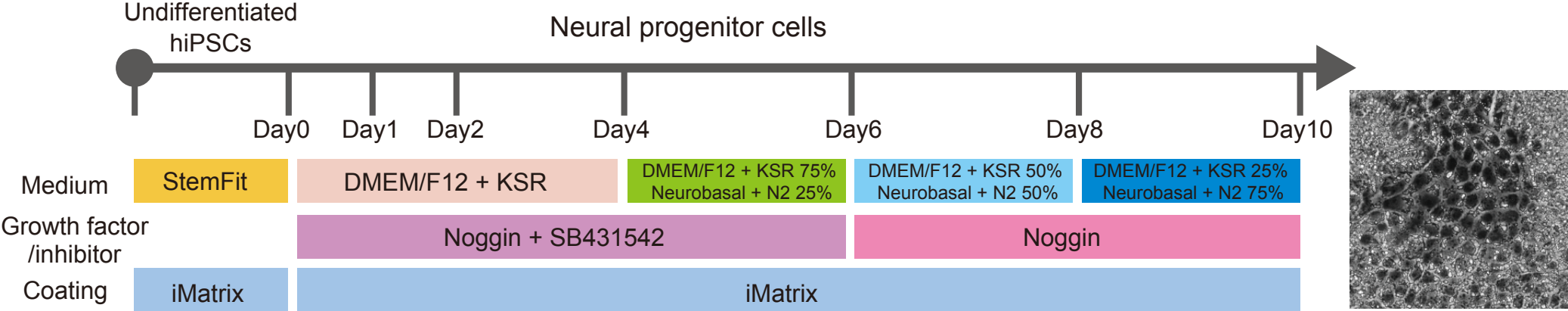
浮遊培養法 (Suspension)



浮遊培養系での分化誘導法を用いてNS/PC分化誘導を行い、NPC細胞マーカーのPAX6, SOX1, NESの発現量をqRT-PCRを用いて定量した。10株のhiPSC株間においてNS/PC細胞マーカーの発現に違いが認められた。つまり、hiPSCは株間で分化のしやすさ(分化傾向)に大きなバラツキがある。

10株のhiPSC株の神経幹／前駆細胞（NS/PC）への分化傾向の解析（接着培養法）

接着培養法（Adhesion）



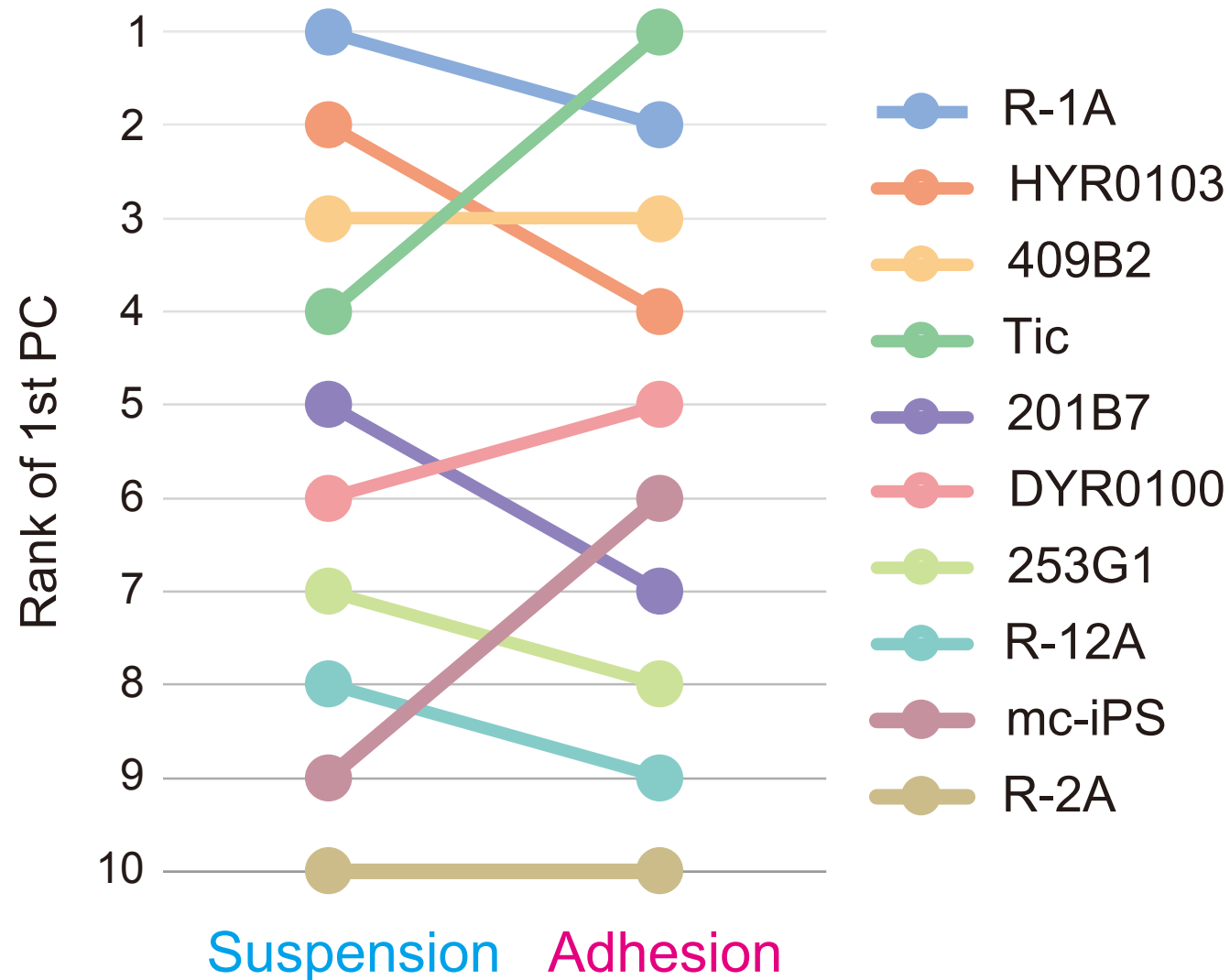
接着培養系での分化誘導法を用いてNS/PC分化誘導を行い、NPC細胞マーカーの*PAX6*, *SOX1*, *NES*の発現量をqRT-PCRを用いて定量した。接着培養法の分化誘導系においても、hiPSC株間においてNS/PC細胞マーカーの発現に違いが認められた。

10株のhiPSC株のNS/PC分化傾向の順位

第一主成分得点(PC1)

		Diffrentiation	
		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

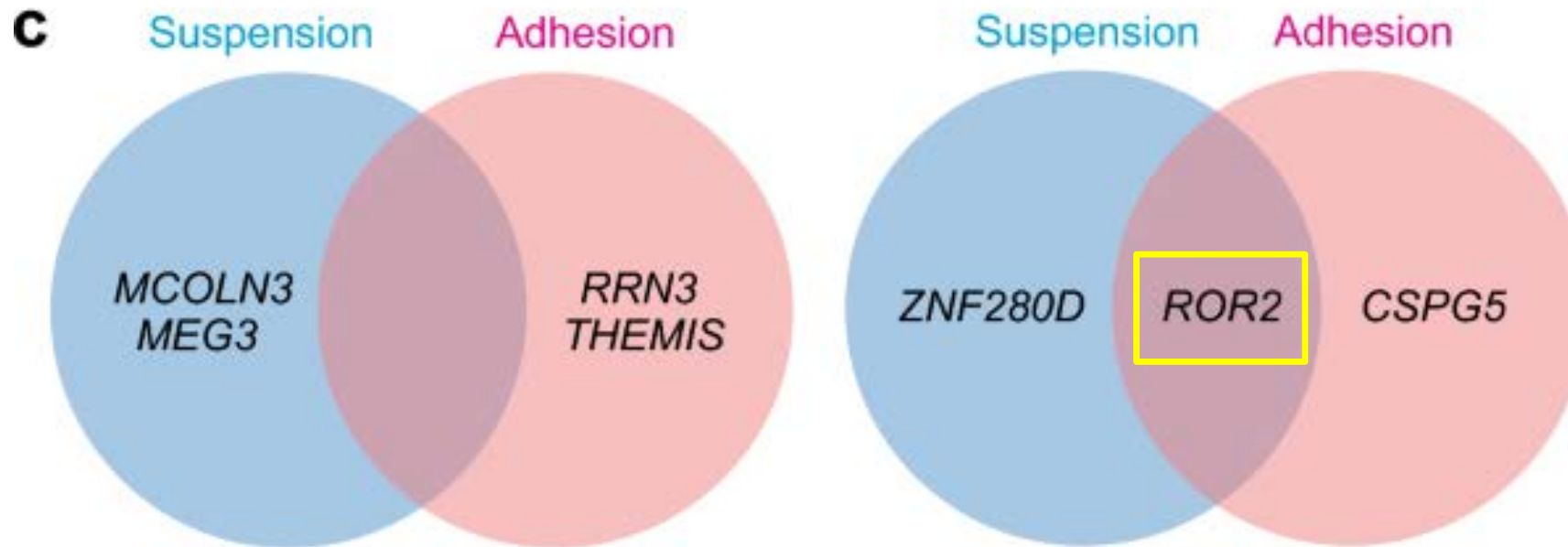
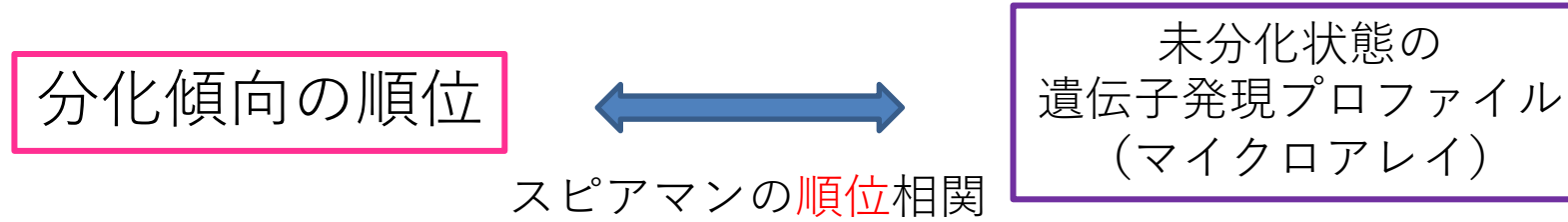
PC1順位 → NPC分化傾向の順位



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

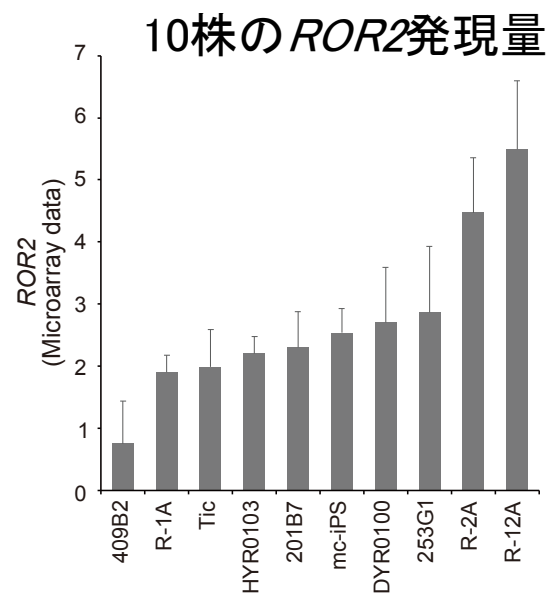


正相関：発現が高い株が分化しやすい

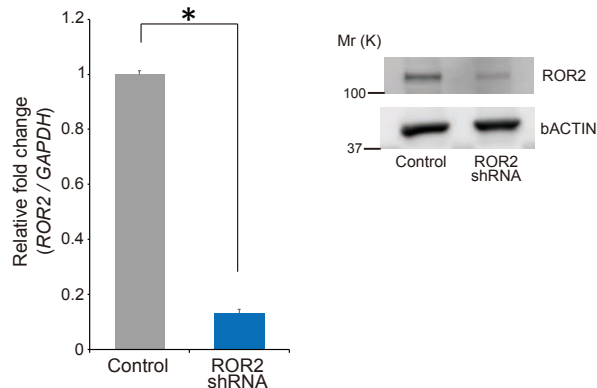
負相関：発現が低い株が分化しやすい

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。

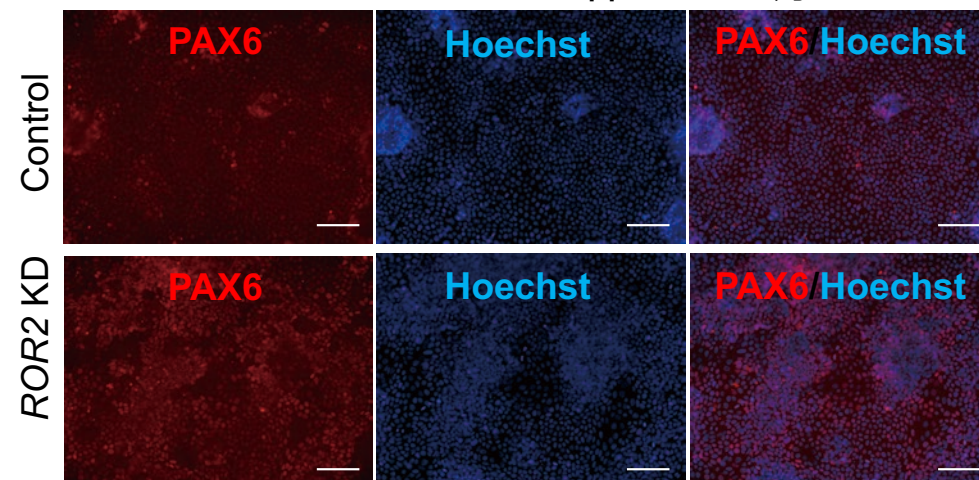
NS/PC分化予測マーカー候補遺伝子ROR2の機能解析



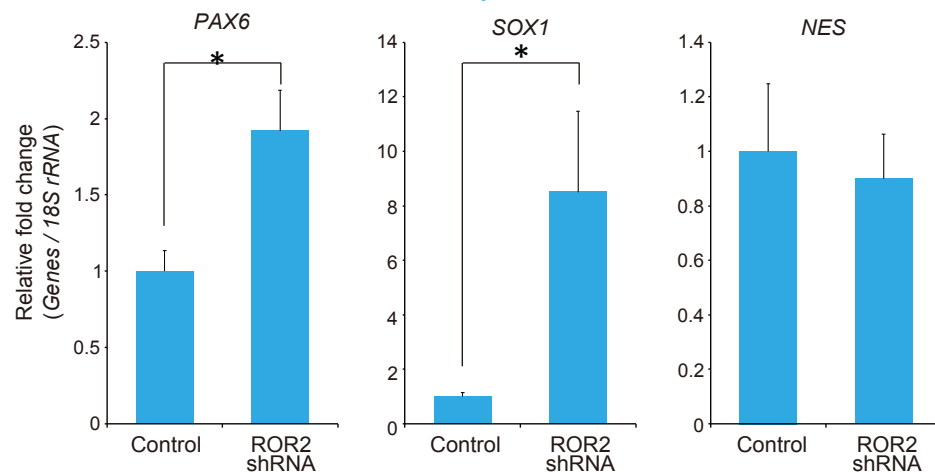
ROR2 Knock-down株の作製 (親株: R-2A株)



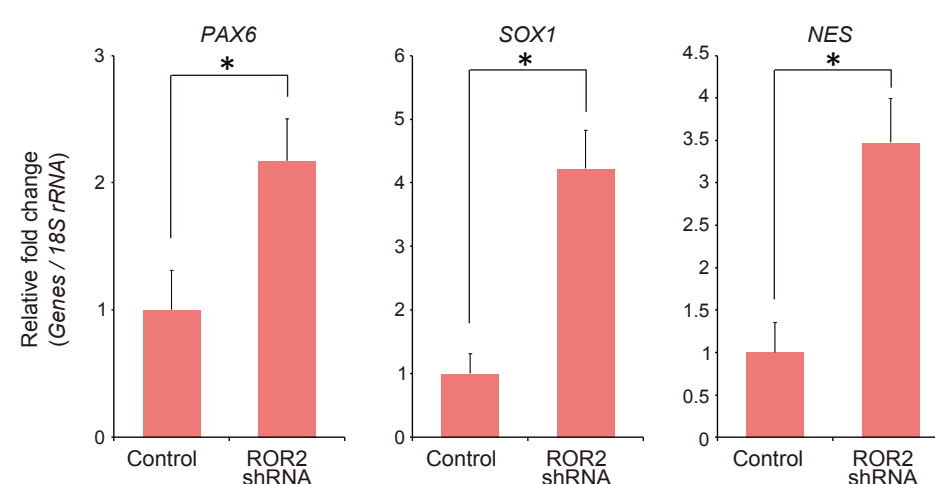
ROR2 Knock-down株のNPC分化



Suspension



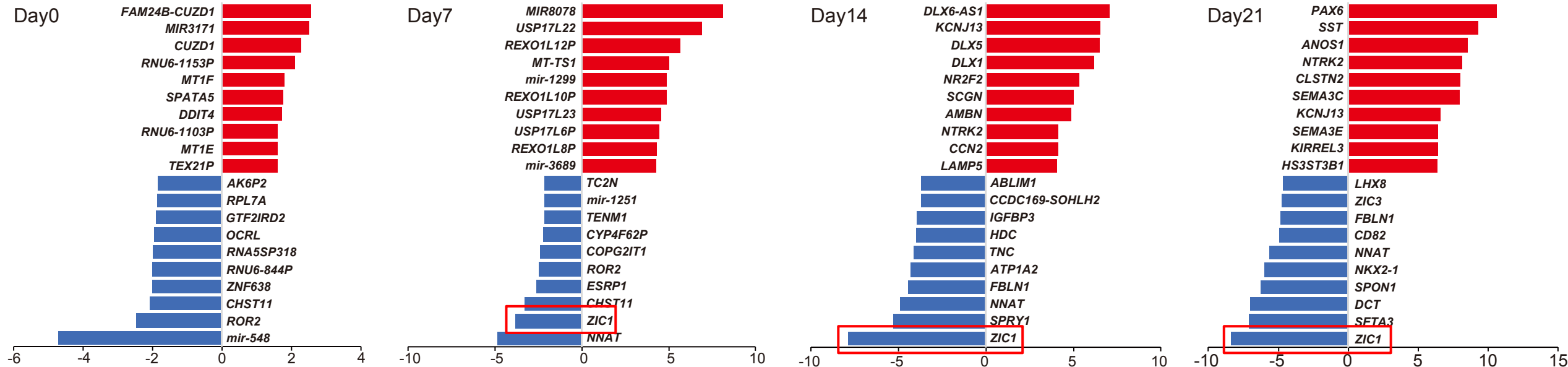
Adhesion



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。

ROR2 KD株を用いた神経分化過程における経時的・網羅的遺伝子発現解析

Clariom D array (Control vs ROR2 KD)

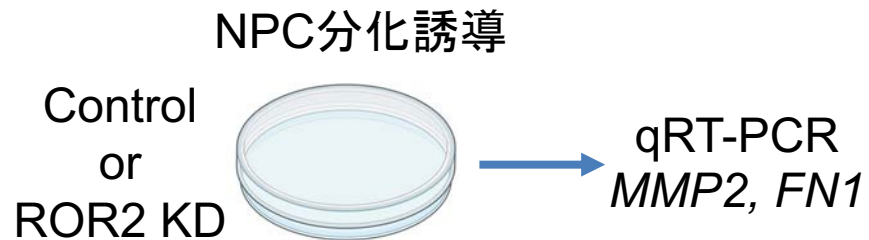


Neural crest分化に重要な転写因子であるZIC1が著しく抑制されていた

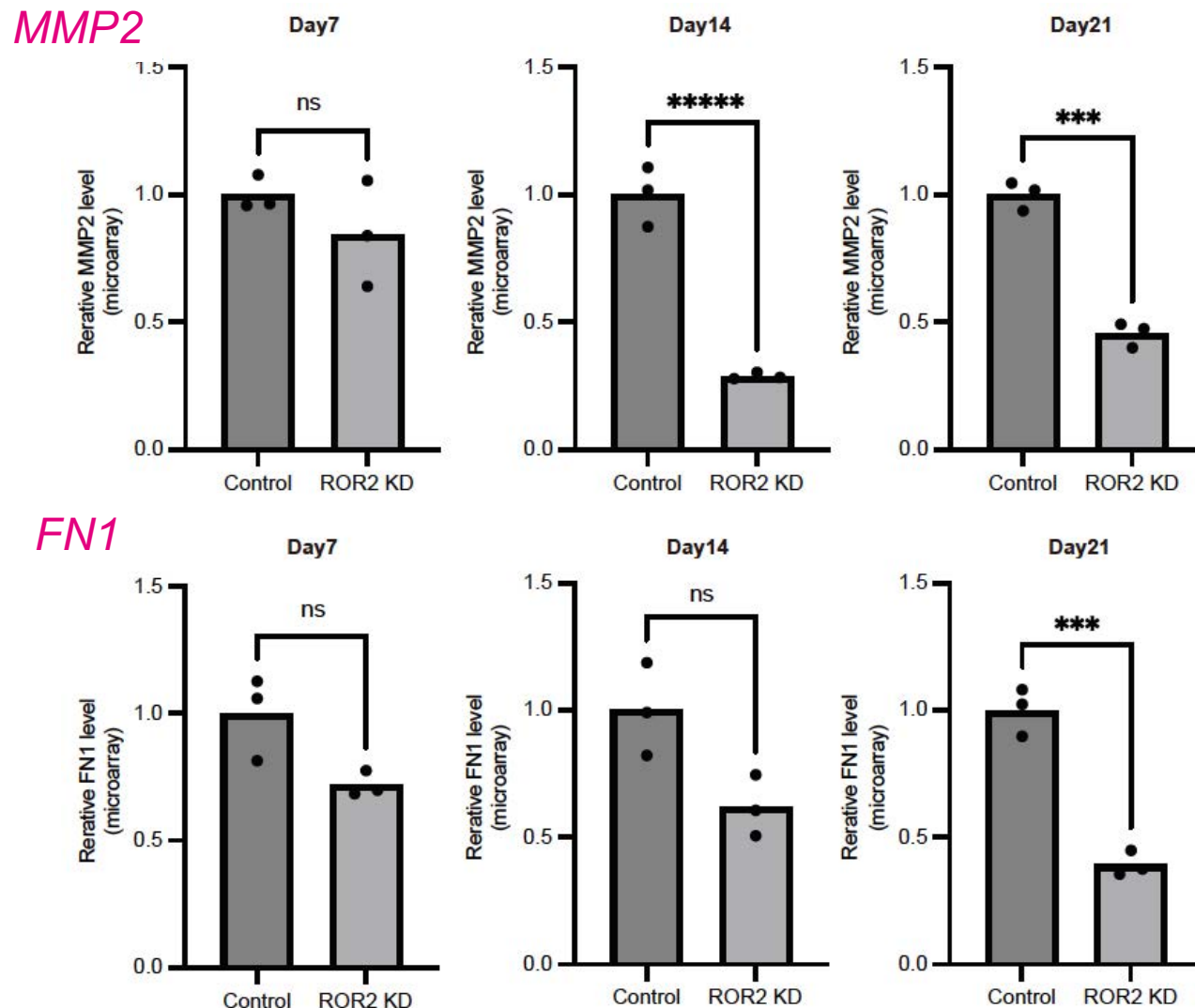
ROR2は分化過程におけるhiPSCの上皮間葉転換(EMT)に機能的に寄与する

ROR2 → EMT → Neural crest

ROR2はEMT関連遺伝子の発現の活性化に関与していることが知られている。また、Neural crestはEMTを経て形成される。



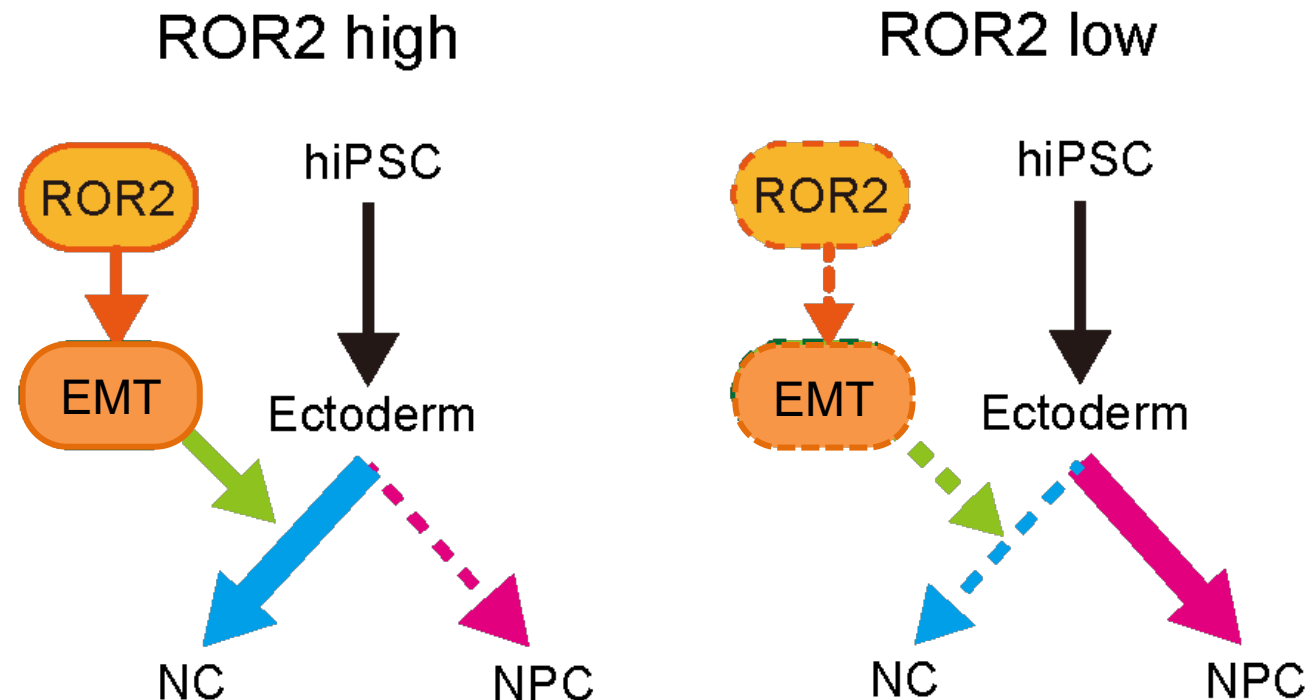
ROR2 KD株のNS/PC分化期におけるEMT関連遺伝子の発現



ROR2 KD株の神経分化において、EMT関連遺伝子である**MMP2**および**FN1**遺伝子の発現も抑制された。

ROR2 に関する結論 & 考察

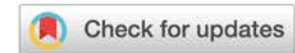
- 2種類のNS/PC分化誘導法で共通して有意な負相関を示す遺伝子としてNS/PC分化予測マーカーROR2を同定した。
- ROR2をKnock-downすると、NS/PC分化が促進されることから、ROR2は機能的にNS/PC分化に関与し、汎用性が高いマーカーであることが示唆された。
- ROR2 KD株では、NS/PC分化過程においてNeural crest分化に重要なZIC1の発現が著しく抑制されていた。
- ROR2 KD株では、NS/PC分化期においてEMT関連遺伝子がControl株に比べて低下していたことから、ROR2はEMTを介したNS/PC分化とNeural crest分化の分岐の調節に関与していることが示唆された。



「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



OPEN

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

Takuya Kuroda^{1,2}, Satoshi Yasuda^{1,2,3}, Satoko Matsuyama^{1,4}, Takumi Miura^{1,2,5}, Rumi Sawada¹, Akifumi Matsuyama⁴, Yumiko Yamamoto⁶, Masaki Suimye Morioka⁶, Hideya Kawaji^{6,7}, Takeya Kasukawa⁶, Masayoshi Itoh⁶, Hidenori Akutsu⁵, Jun Kawai^{2,6} & Yoji Sato^{1,2,3,8,9}✉

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質・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の最終製品の重要品質特性(CQA)や原料の重要物質特性(重要原料特性, CMA)をすべて特定・管理することは、ほぼ不可能。
- 細胞加工製品の「真の有効成分細胞」の特定、隠れた特性の理解や、細胞加工製品の原料(例:iPS細胞)の隠れた特性の理解には、細胞集団内の不均一性(例:MSCの亜集団)や細胞集団間の不均質性(例:iPS細胞株間)をその効力・有効性にもとづき分類・理解するための新たな科学、言わば、Stem Cell Pharmacotaxonomy「幹細胞薬理分類学」が必要。

薬理学のセンスが必要！
- 各種のトランスクリプトーム解析や画像解析などに基づき、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の合理的で柔軟かつ再現性の高い製造方法の確立(確固としたCQA/CMAに基づく規格設定)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。



Acknowledgements

Collaborators

NIHS



Takumi Miura

Takuya Kuroda

Fumiya Ohashi

Takamasa Hirai

Shinji Kusakawa

Satoko Matsuyama

Rumi Sawada

Shiori Tachi

Megumi Takano

Keiko Tano

Satoshi Yasuda

NCCHD

Hidenori Akutsu

Tohru Sugawara

Akihiro Umezawa

**Osaka Habikino
Medical Center**



Akifumi Matsuyama

Osaka Univ.



Emiko Ito

Shigeru Miyagawa

Atsuhiko Saito

Shohei Yoshida

Yoshiki Sawa



RIKEN Yokohama



Tsukasa Kouno

Masayoshi Itoh

Takeya Kasukawa

Hideya Kawaji

Jay W. Shin

Masaki Suimye Morioka

Yumiko Yamamoto

Jun Kawai

Terumo



Tadashi Sameshima



**Yokohama
City Univ.**

TMiMS

**Tokyo Metro.
Inst. Med. Sci.**



A*STAR



**Kanagawa
Inst. Indust.
Sci. Tec.**

Funded By



神奈川県
Kanagawa Prefectural Government

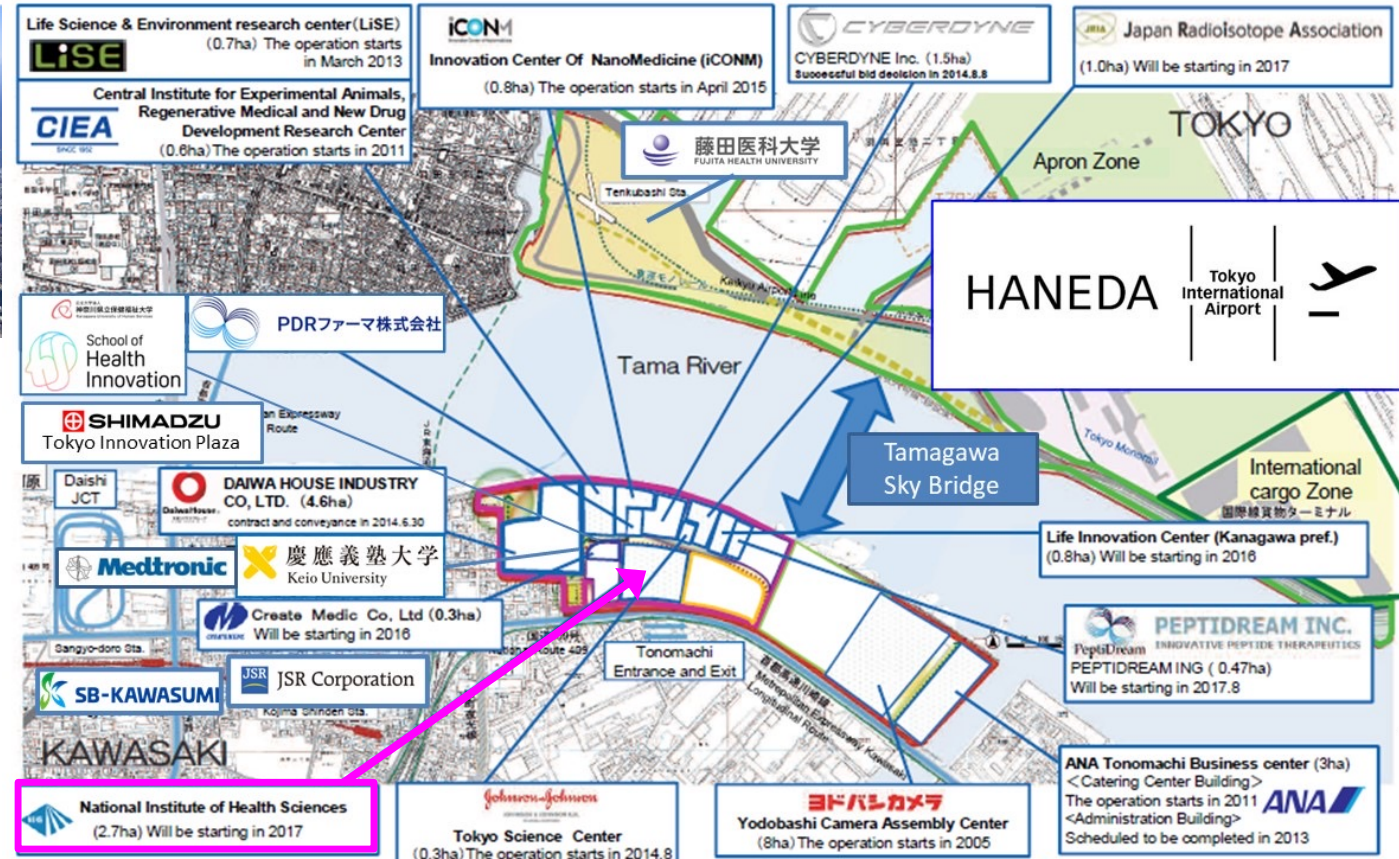
ご清聴、ありがとうございました



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



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

** <http://www.city.kawasaki.jp/en/page/000003680.html> を改変