



令和元年10月10日
パシフィコ横浜

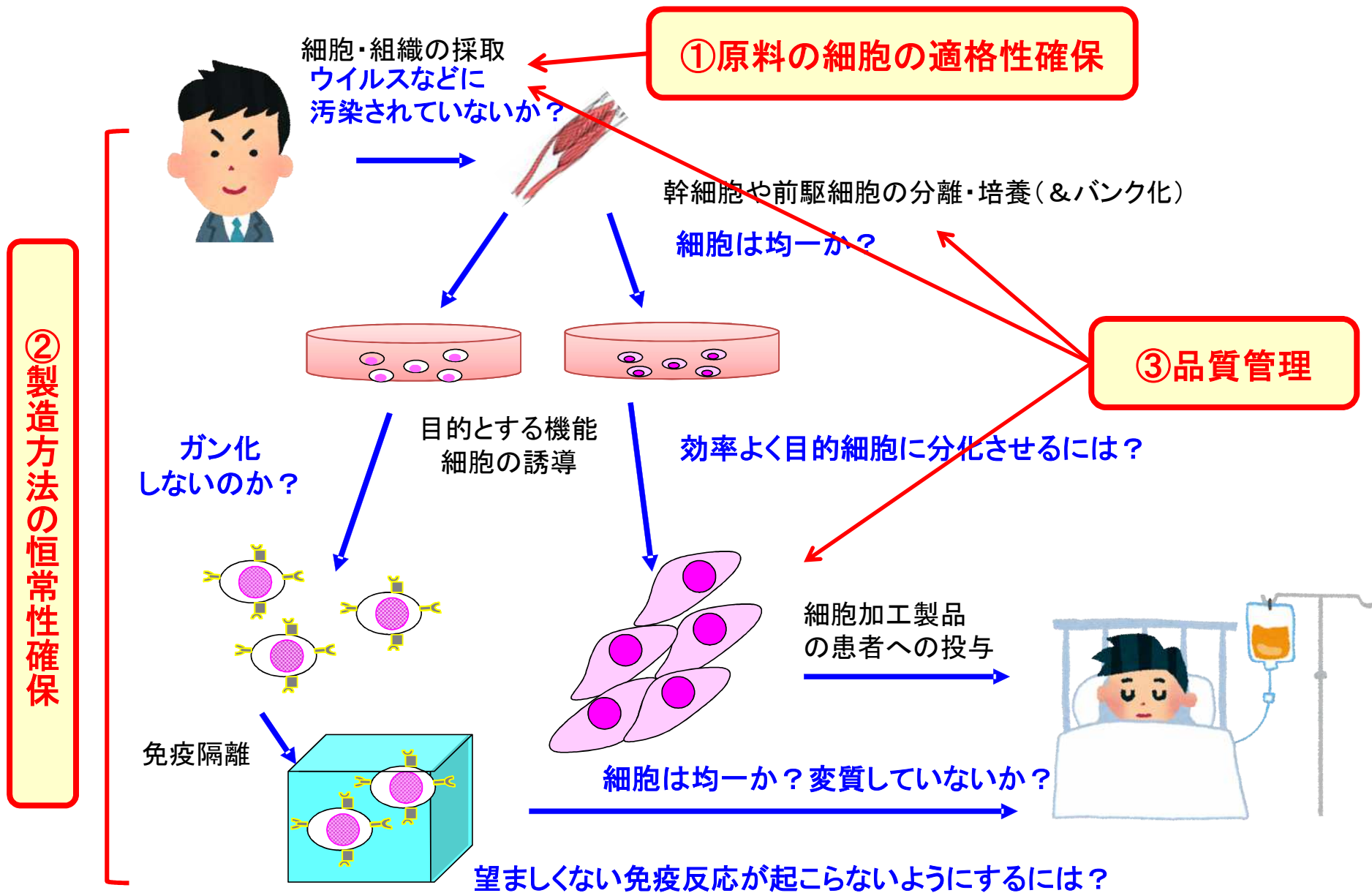
BioJapan 2019

「生もの」である再生・細胞医療製品の 品質を確保するための手法の開発

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

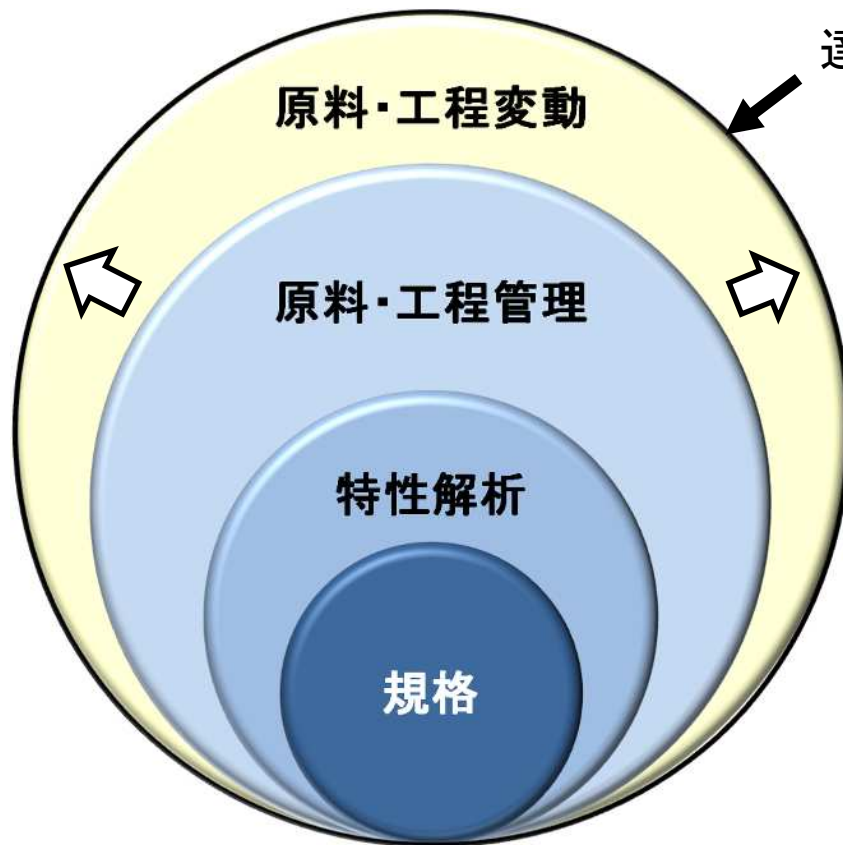
本発表で述べられている見解は発表者の私見であって、国立医薬品食品衛生研究所
および厚生労働省ならびに日本再生医療学会の公式な見解では必ずしもありません

細胞加工製品(再生医療等製品)の品質・有効性・安全性の確保

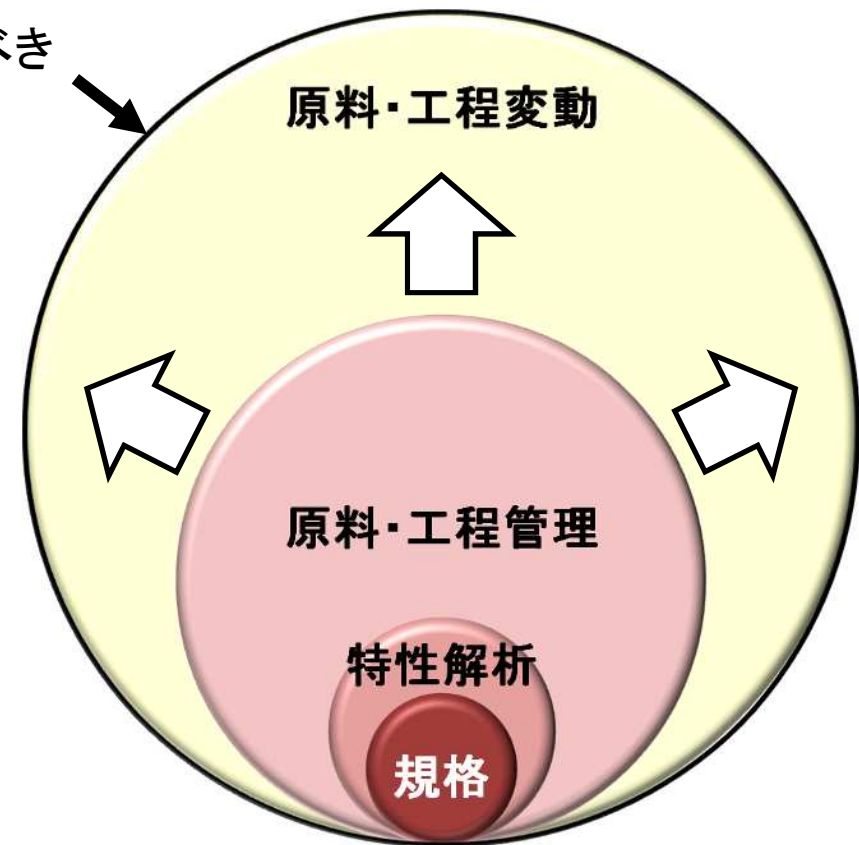


品質管理戦略の方針

バイオ医薬品のイメージ



再生医療等製品のイメージ



- 規格・特性解析で品質をすべて把握することは困難。
=再生医療等製品ではその特徴から限られた情報しか得られない。
- 原料及び製造工程のコントロールにより品質を管理する考え方が重要となる。

「生きた素材」を使った「ものづくり」

ウイスキー酵母



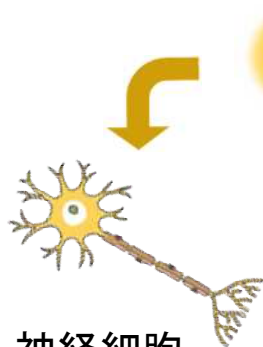
ビール酵母

ワイン酵母

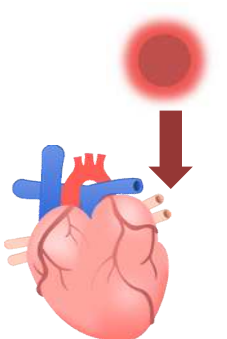


清酒酵母

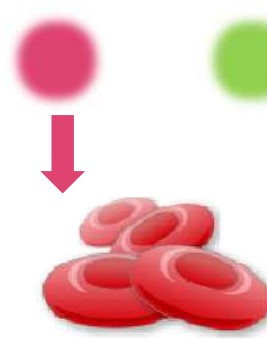
目的に合った酵母(素材)を使い分けることで、各品目で美味しい(高品質な)製品を作ります
「素材へのこだわり」「至高の素材」「厳選素材」「選び抜かれた素材」



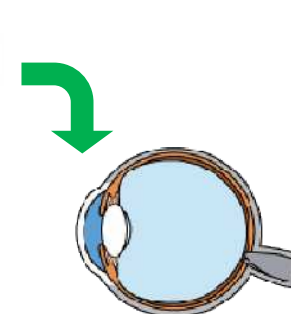
神経細胞



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

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

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

「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

Fumiya Ohashi^{1,2,3,4}, Shigeru Miyagawa², Satoshi Yasuda¹, Takumi Miura¹, Takuya Kuroda¹, Masayoshi Itoh⁵, Hideya Kawaji^{5,6}, Emiko Ito², Shohei Yoshida², Atsuhiko Saito², Tadashi Sameshima⁴, Jun Kawai⁵, Yoshiki Sawa² & Yoji Sato^{1,3,7,8,9}

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.

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

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所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所、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。

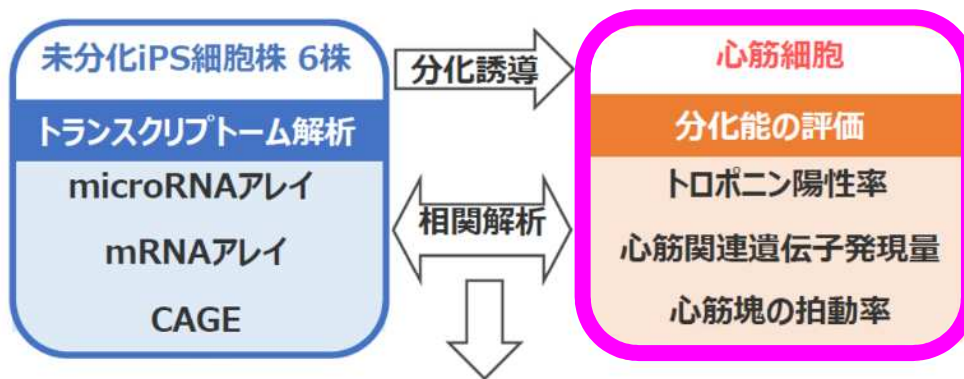
ヒトiPS細胞から誘導される細胞を再生医療に応用するためには、目的とする細胞に分化しやすいiPS細胞株を選ぶ必要があります。目的とする細胞に分化しにくいiPS細胞を選んでしまうと、分化していないiPS細胞が移植する細胞の中に残りやすくなり、こうした残存した未分化iPS細胞が患者さんの体内で腫瘍を形成するリスクが高くなるからです。

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。

「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

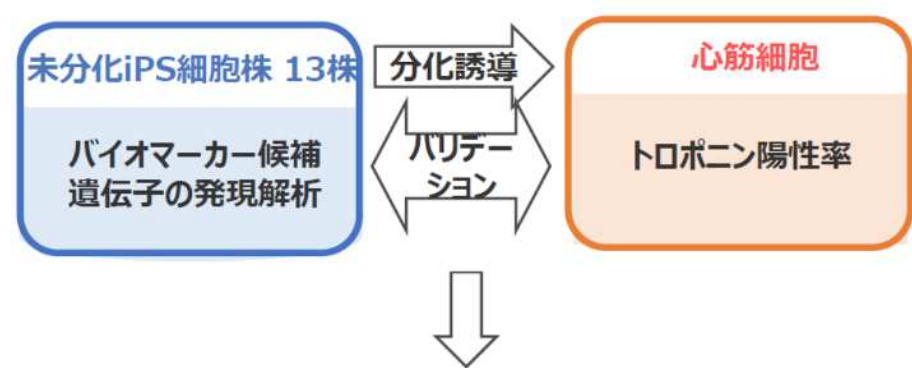
トレーニングセット



バイオマーカー候補遺伝子

候補遺伝子を絞りこむ

テストセット



バイオマーカー選択

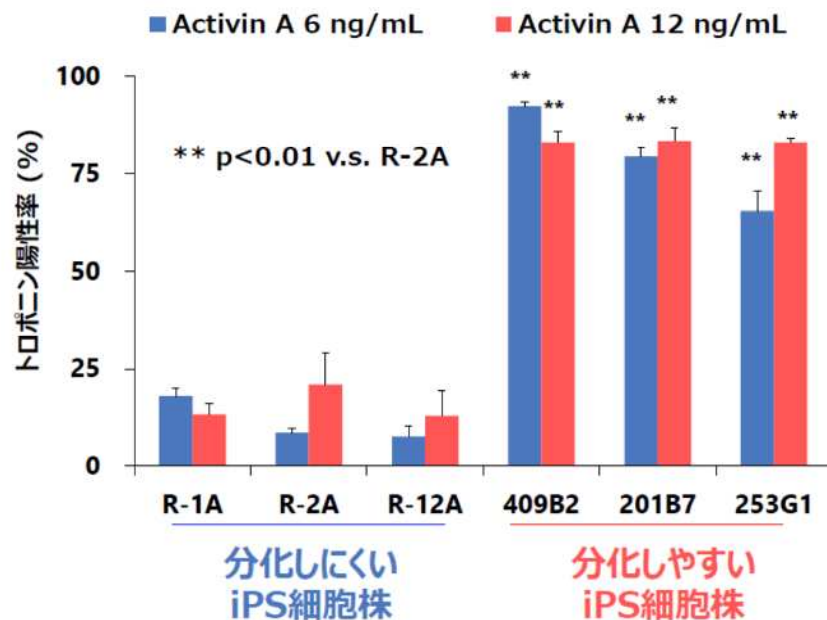
候補遺伝子のバリデーション



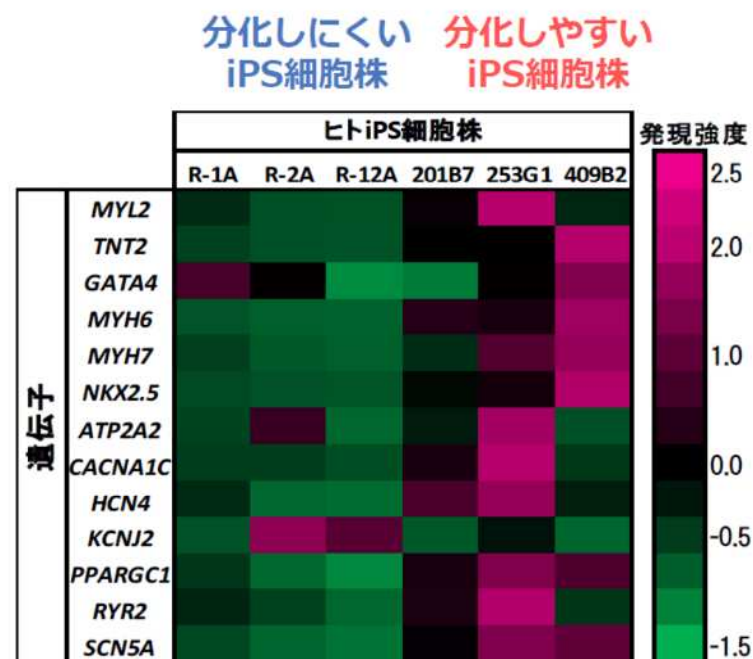
「目的細胞へのなりやすさ」を予測するための iPS細胞バイオマーカー（心筋細胞）

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

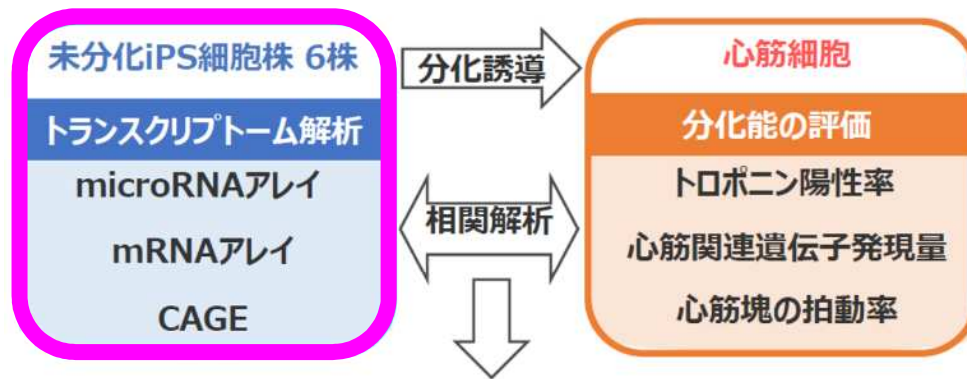


iPS細胞株による心筋分化しやすさの違いが明らかになった

「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

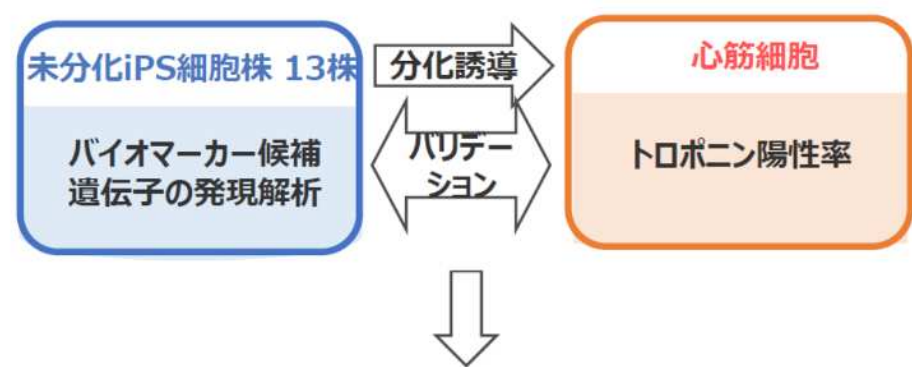
トレーニングセット



バイオマーカー候補遺伝子

候補遺伝子を絞りこむ

テストセット



バイオマーカー選択

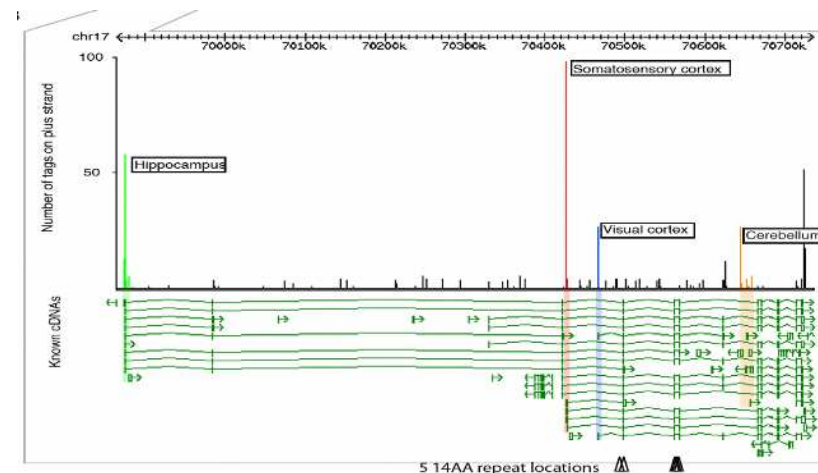
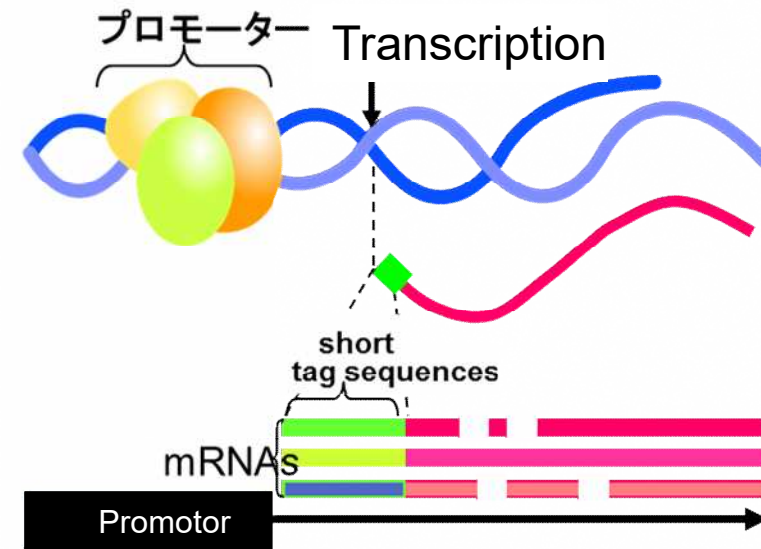
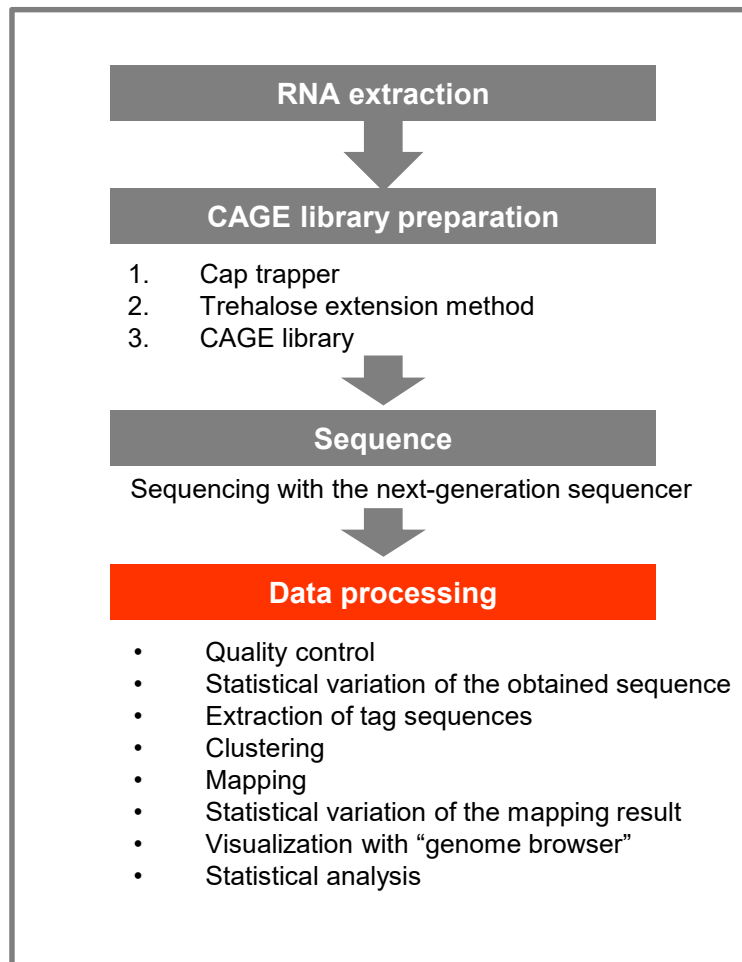
候補遺伝子のバリデーション



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

CAGE (Cap Analysis of Gene Expression)



**CAGE: FANTOMコンソーシアムのコア技術
として活用されている**

理化学研究所のマウスゲノム百科事典プロジェクトで収集された完全長cDNAのアノテーション(機能注釈)を行うことを目的に、林崎良英博士が中心となり2000年に結成された国際研究コンソーシアム

京都大学・山中伸弥教授らの、iPS細胞の樹立研究では、細胞の初期化因子候補として24種の転写因子をFANTOMデータベースから選定。

現在、プロモーターごとの遺伝子発現をゲノムワイドに調べる方法は、CAGEしかない。

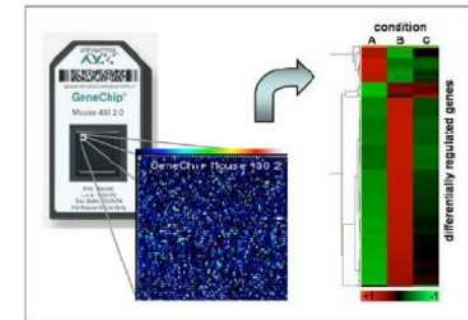
「細胞の顔つき」をトランスクリプトームの言葉で最も詳しく記述できる手法。

「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**）

遺伝子解析手法の違い

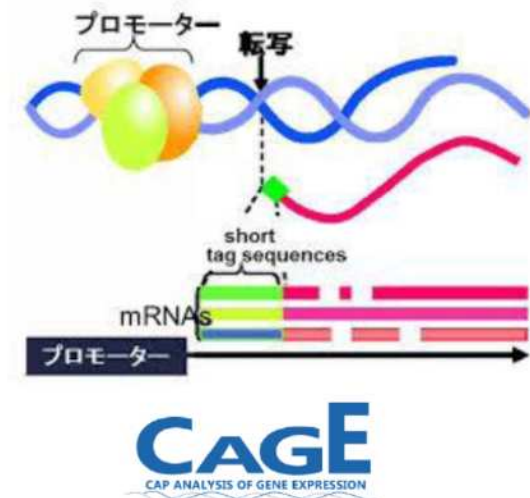
マイクロアレイ解析：従来法

- 短い時間で実験結果が得られる
- 解析の手間が少ない
- △遺伝子リード数が少ない
- △既知の遺伝子が対象



CAGE解析：転写物の5'末端から塩基配列を決定

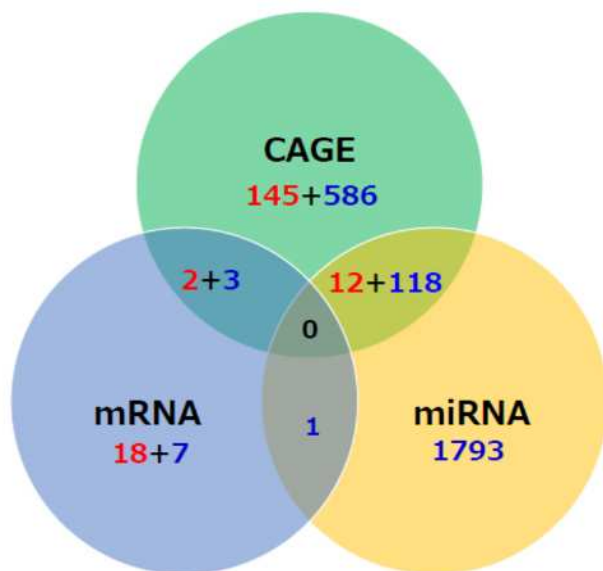
- 遺伝子リード数が多い（4万以上）
- 新規の遺伝子を発見できる可能性がある
- 転写開始点の測定から網羅的にプロモータ活性が測定できる
- △解析の手間に手間がかかる
- △実験コスト（日数や費用）



「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



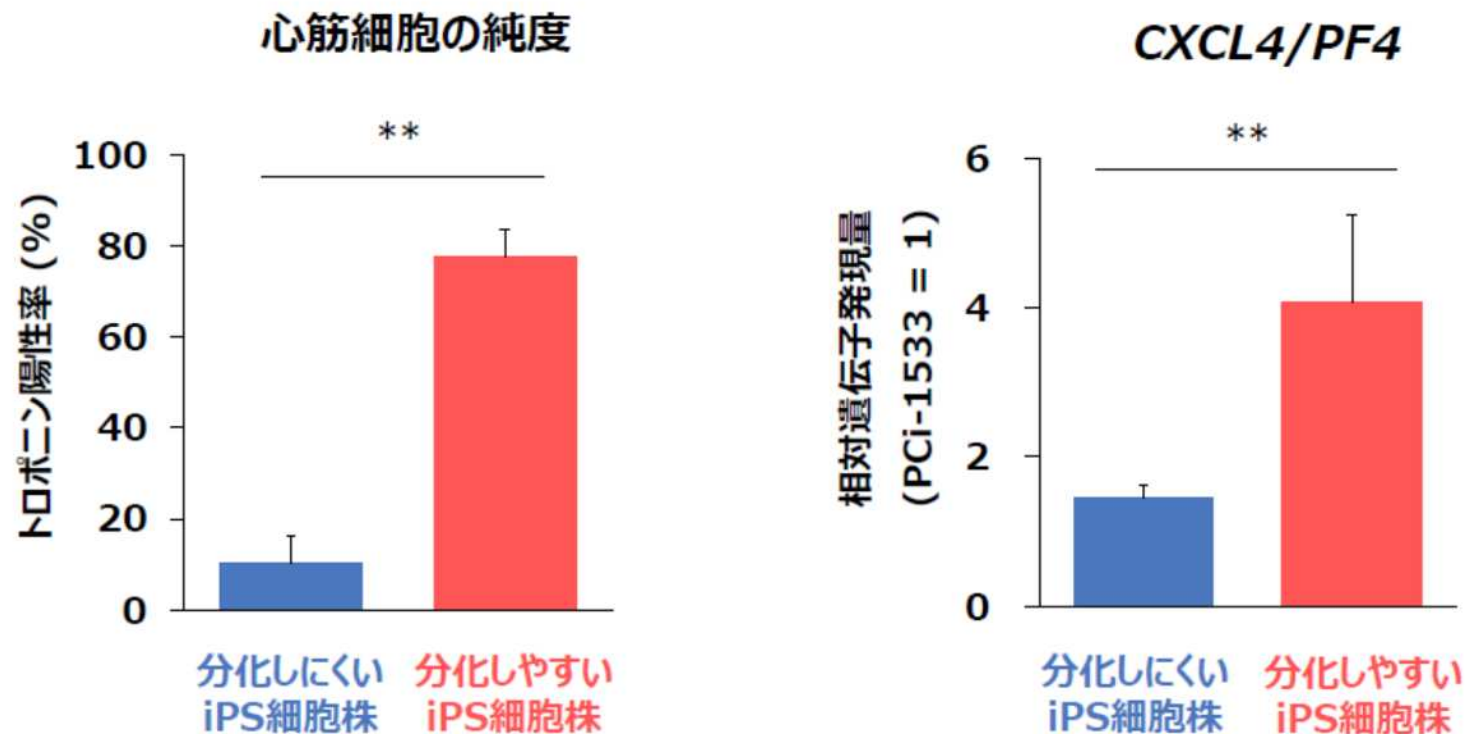
バイオマーカー候補遺伝子

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

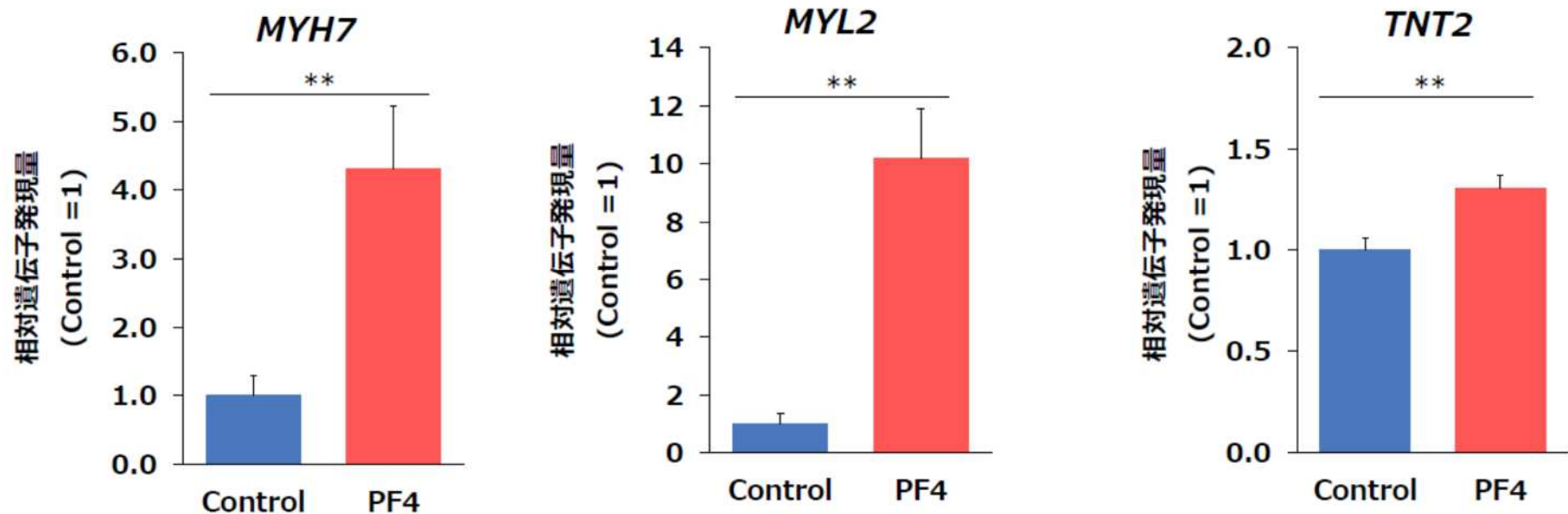
テストセット(13株)でのバイオマーカー候補遺伝子のバリデーション



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

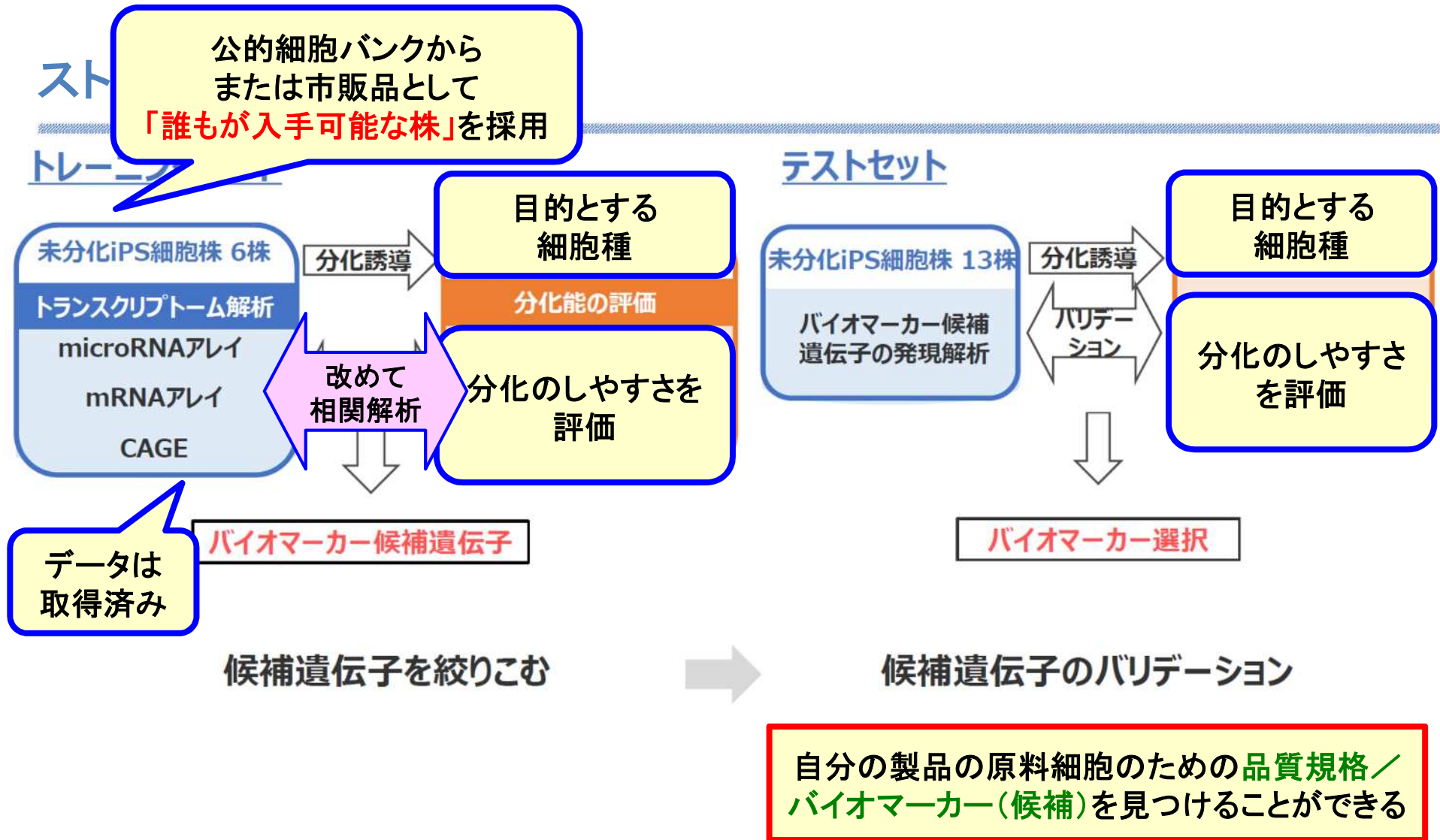
「目的細胞へのなりやすさ」を予測するための iPS細胞バイオマーカー（**心筋細胞**）

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（XXX細胞）



再生医療等製品の品質・安全性評価プロジェクト 理化学研究所 河合純、国衛研 佐藤陽治



背景・強み・資源	ダナフォーム	理研	国衛研	KISTEC	評価連携機関
	NGS関連技術 試薬提供 ・NGS関連試薬 ・NGS解析サービス	NGS関連技術 ・次世代シーケンサー解析技術 ・CAGE技術・遺伝子ネットワーク解析技術・細胞等	再生医療関連評価技術 ・レギュラトリーサイエンス研究 ・ヒト細胞加工製品の品質評価法の開発実績	抗菌・抗ウイルス評価チーム ・コンサルテーション ・技術ノウハウの蓄積	横浜市立大学 ・たんぱく質解析 産業支援機関 <u>株式会社エスピー</u> ・LIC4階インキュベート

の地域や産業界への貢献	コアテーマ (理研・国衛研・KISTEC)
	再生医療等製品 (ヒト細胞加工製品) の品質・安全性確保並びにガイドライン作成に資する データ創出基盤パイプラインの設計

再生医療等製品を開発し、普及する上で重要な「ヒト細胞加工製品」の品質と安全性の確保に寄与！

「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

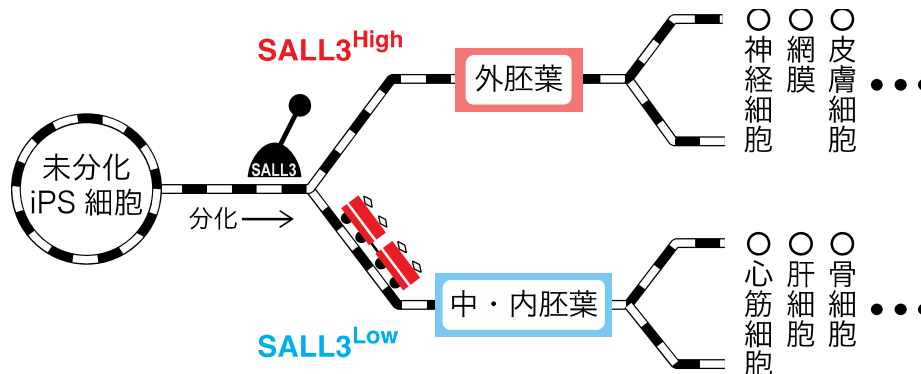
ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09571-4> 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

AMED 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。

厳選した「生きた素材」を囲い込む

iPS細胞の**基本特許の期間はあと10年ていど？**
では「再生医療等製品」の**本格的実用化・産業化はいつか？**



「厳選素材」(セル・バンク)あるいはその品質規格を門外不出にすれば、良い製品を独占的に長期にわたり売り続けることができる

ご清聴、ありがとうございました！

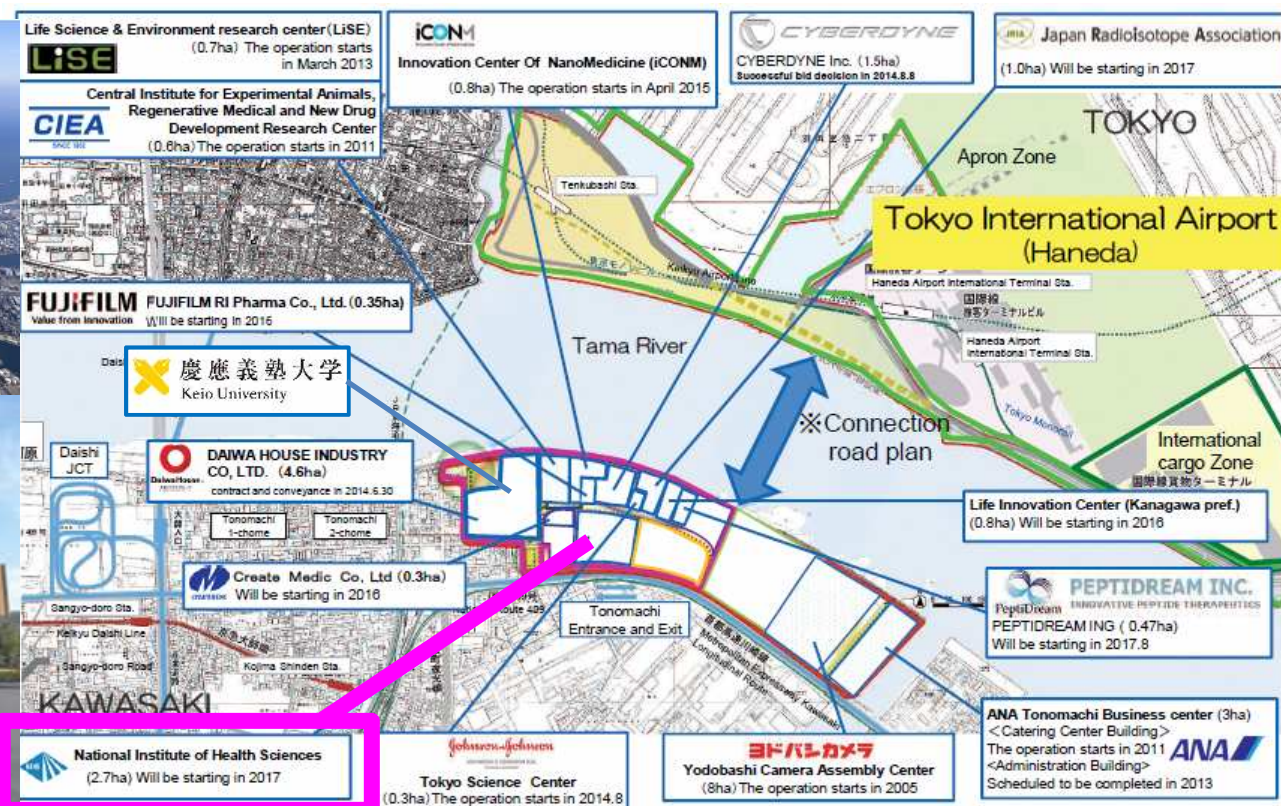
佐藤陽治

国立医薬品食品衛生研究所 再生細胞医療製品部

E-mail: yoji@nihs.go.jp



*



**

* <https://upgradedpoints.com/how-to-earn-tons-of-british-airways-avios-points/>

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