OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	CXCL4/PF4 is a predictive biomarker of cardiac differentiation potential of human induced pluripotent stem cells
Author(s)	大橋, 文哉
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/73508
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　大橋　文哉　）	
論文題名	CXCL4/PF4 is a predictive biomarker of cardiac differentiation potential of human induced pluripotent stem cells (CXCL4/PF4がヒトiPS細胞由来心筋細胞の分化能を予測できるバイオマーカーである)

論文内容の要旨

【背景】

iPS細胞は様々な細胞へ分化しうる多能性を有しており、再生医療や薬剤スクリーニングへの応用が進みつつある。近年では創薬研究用に疾患を持つ患者の体細胞から樹立した疾患特異的iPS細胞株や再生医療用にいくつかのHLA型のiPS細胞株のストックも行われ、様々な種類のiPS細胞株が作成されている。一方、ES細胞やiPS細胞は株の種類により、各組織への分化指向性が異なることが分かってきた。その原因としてはエピジェネティックな変化の影響を受ける可能性が報告されている。iPS細胞は由来となる体細胞の遺伝子的背景が大きく異なるので、ES細胞と比べて分化誘導効率がばらつく可能性が考えられる。また、目的とする組織に応じて最適なiPS細胞を選ぶための指標が求められるが、未分化マーカーではその分化指向性を判別することができない。そこで、我々は心筋細胞に分化しやすいiPS細胞株をスクリーニングするためのバイオマーカーを探索することを本研究の目的とした。これまでバイオマーカーは単一の遺伝子解析プラットフォームを用いて探索されてきたが、数多くの候補遺伝子から偽陽性を最小限にして、最適なバイオマーカーを選ぶことは困難な作業である。そこで、本研究ではCAGE解析、mRNAアレイ解析、microRNA解析を組み合わせることで、バイオマーカーを特定可能であることを仮説とした。

【方法および結果】

(1) 6種類のiPS細胞株で同一の分化誘導法を用いて、心筋細胞へ分化誘導を行った。分化誘導後の心筋細胞をフローサイトメトリーや定量PCR等で解析して、心筋細胞への分化指向性が高いiPS細胞株(High)と低いiPS細胞株(Low)に群分けをした。その結果、High群とLow群の2群間のトロポニン陽性率に有意な差があった（High v.s. Low: 81.1%±3.3% vs 13.6±1.9%; $p<0.01$, $n=6$）。また、High群では分化誘導後の未分化細胞の残存率がLow群と比べて有意に低い結果であった。

(2) 未分化細胞の遺伝子発現を網羅的に解析するためにmRNAアレイ解析、microRNAアレイ解析、CAGE解析を用いた。分化指向性のHigh群とLow群の2群間で未分化細胞の遺伝子発現量を比較して、有意な変化があった遺伝子群を抽出した。その結果、High群ではWNTシグナルやミトコンドリア機能に関連する遺伝子群がLow群と比べて有意に高かった。また、遺伝子解析手法を組み合わせることで分化指向性を予測できる可能性がある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。

(3) テストセットとして13種類のiPS細胞を用いて心筋細胞の分化能をバイオマーカー候補遺伝子で判別可能かをバリデーションした。High株とLow株の2つの群に分けて、バイオマーカー候補遺伝子の発現量を比較した結果、22個の遺伝子のうち20個の遺伝子で2群間の有意な差は見られなかったが、2つの候補遺伝子はテストセットでも有意な差が見られた。正に相関した遺伝子として*CXCL4/PF4*があり、負に相関した遺伝子として*TMEM64*があった。

(4) 心筋細胞への分化誘導に関連するシグナル伝達の調整実験を行い、同一iPS細胞株で心筋細胞への分化誘導の変化とバイオマーカーが相関するかを検証した。WNTシグナル伝達の阻害剤、刺激剤、ミトコンドリア機能の阻害剤、対象としてDMSOを分化誘導前のiPS細胞にそれぞれ添加して、心筋細胞へ分化した。その結果、WNTシグナルの刺激やミトコンドリア機能の阻害により、心筋細胞への分化誘導効率がコントロール群と比べて低下した。その心筋分化誘導効率の変化と相関して*CXCL4/PF4*発現量が低下していたが、*TMEM64*は相関性が見られなかった。

(5) 心筋細胞への分化誘導におけるPF4の機能を調べるために、分化誘導前のiPS細胞にPF4を2日間前処理してから心筋細胞へ分化誘導を行った。その結果、PF4処理群では対照群と比べて、分化誘導後の心筋細胞関連遺伝子（*MYH7, MYL2*および*TNT2*）の発現が有意に高くなり、強く拍動する胚葉体数が増加した。

【結論】

*CXCL4/PF4*の発現量が高いiPS細胞株が心筋細胞への高い分化指向性を有する可能性あり、心筋細胞を製造する上で最適なiPS細胞株を選ぶための新たなバイオマーカーになりうることが示唆された。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（大橋　文哉）		
	（職）	氏　名
論文審査担当者	主 査　教授 副 査　教授 副 査　教授	佐藤　陽治 水口　裕之 藤尾　慈

論文審査の結果の要旨

【背景】ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた心不全治療は、移植医療の臓器不足問題等を克服するものとして高い期待を集めている。一方、ヒトiPS細胞は、体を構成する全ての細胞種に分化することができるとされているものの、iPS細胞株ごとに各細胞種への分化指向性が異なることが多数報告されている。心筋細胞への分化指向性の低い細胞株を用いて心筋細胞を製造した場合、心筋細胞集団中での未分化iPS細胞の混在量が多くなると考えられる。未分化なiPS細胞は固有の性質として造腫瘍性をもつため、その混在はヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた心不全治療における危険因子（ハザード）となる。従って、治療用ヒトiPS細胞由来心筋細胞の品質・安全性確保の上では、適切な分化指向性を持つiPS細胞株を原料として選択することが求められる。ただし、iPS細胞の未分化性のバイオマーカーではその分化指向性を判別できない。そこで本研究では、iPS細胞の網羅的な遺伝子発現解析データとその心筋細胞への分化効率との相関を解析することにより、心筋細胞への分化指向性の予測マーカーを同定できることを仮説とし、心筋細胞に分化しやすいiPS細胞株をスクリーニングするためのバイオマーカーの同定を試みている。

【方法】①ヒトiPS細胞 6株（トレーニングセット）から一定の分化誘導プロトコールで心筋細胞へ分化誘導した。誘導4日目の胚葉体から胚葉体関連遺伝子の発現量、誘導17日目の心筋細胞を用いてフローサイトメトリー解析や定量PCR解析、免疫染色、拍動解析を行った。その結果をもとに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2群にグループ分けをした。②トレーニングセットの iPS細胞株について、分化誘導前にmicroRNAアレイ、mRNAアレイ、CAGE (cap analysis of gene expression)を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果をもとに、心筋細胞への分化指向性順位の上位と下位の2群で発現量に有意な差がある遺伝子(バイオマーカー候補遺伝子)を抽出した。③テストセットのヒトiPS細胞13株を用いて候補遺伝子のバリデーションを行い、トレーニングセットと同様な発現を示す遺伝子を抽出した。④WNTシグナルの調節薬剤及びミトコンドリア機能阻害剤によるバイオマーカー候補遺伝子の発現量の変化並びにそのヒトiPS細胞の心筋細胞分化との相関を検討した。また、バイオマーカー候補遺伝子由来のリコンビナントタンパク質がヒトiPS細胞の心筋細胞分化に与える影響を検討した。

【結果・考察】①フローサイトメトリー解析、組織学的評価や定量PCR解析により、トレーニングセットのiPS細胞株による心筋分化指向性の違いが明らかになった。また、分化しやすいiPS細胞株では分化誘導後の未分化細胞の残存率が分化しにくい株と比べて有意に低かった。②原理の異なる3種の遺伝子解析手法を組み合わせることで分化指向性予測のためのバイオマーカー候補遺伝子は22個に絞り込まれた。③テストセットのiPS細胞株を用いた結果から、バイオマーカー候補遺伝子のうち偽陰性でないと考えられる遺伝子として*CXCL4/PF4*が同定された。④WNTシグナルの刺激やミトコンドリア機能の阻害により、iPS細胞の心筋細胞への分化効率が低下した。この心筋分化効率の低下と相関して*CXCL4/PF4*発現量が低下することが明らかになった。また、リコンビナントのCXCL4/PF4でiPS細胞を前処理することにより、心筋細胞への分化効率が上昇することが明らかとなった。

上の結果から本論文の筆者は、*CXCL4/PF4*の発現量が高いヒトiPS細胞株は心筋細胞への高い分化指向性を有する可能性あり、*CXCL4/PF4*は心筋細胞を製造する上で最適なiPS細胞株を選ぶための新規バイオマーカーになりうると考察している。

【結論】以上の研究成果は、ヒトiPS細胞由来心筋細胞の品質・安全性を高める方法を示すだけでなく、再生・細胞治療に用いられるヒトiPS細胞加工製品の品質規格設定の新たなアプローチ方法を提供するものとして極めて有用であり、本論文は極めて意義深く、博士(薬科学)の学位論文に値するものと認める。