

Application News

No. C209

LC-MS

細胞培地分析プラットフォームC2MAP™ を用いたヒトiPS細胞の未分化性の評価

K. Toyoda, H. Kuroda, T. Suzuki

キーワード：iPS細胞 メタボロミクス 非侵襲的評価法

■要旨

細胞培地分析プラットフォームC2MAPを用いてヒトiPS細胞の培養上清を分析し、未分化/分化状態を示すマーカー成分を同定しました。同定されたマーカー成分をモニタリングすることで、細胞非侵襲的に細胞の状態を評価できる可能性が示されました。

■背景

再生医療の産業化に向けて、高品質かつ大量に細胞を調製し供給する技術開発が求められています。従来、細胞の状態を評価する手法として、遺伝子発現解析などの手法が用いられてきましたが、これらの手法は細胞侵襲的であるため、一般的には培養終了後の評価法として適用されます。我々は培養上清の成分分析による細胞状態の非侵襲的評価法の確立を目指し、液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS/MS）を用いた細胞培地分析プラットフォーム C2MAPを開発しました。

■細胞培地分析プラットフォームC2MAP™

細胞培地分析プラットフォーム C2MAPでは、培養上清をセットするだけでサンプルの前処理からLC-MS/MSによる95成分の一斉分析を自動で行うことができます。また、ビューワーソフトであるC2MAP TRENDSと統計解析ソフトのマルチオミックス解析パッケージをそれぞれ用いて、マーカー候補成分を簡単に探索することが可能です。今回、C2MAP、C2MAP TRENDS、マルチオミックス解析パッケージをそれぞれ用いることで、ヒトiPS細胞の未分化性が評価可能か検討しました。

細胞培地分析自動前処理装置
C2MAP-2030

液体クロマトグラフ質量分析計
LCMS-8060



細胞培地分析プラットフォーム
C2MAP™

ビューワーソフト
C2MAP TRENDS



マルチオミックス解析パッケージ（別売り）



■実験方法

TeSR-E8を用いて、ヒトiPS細胞を6日間未分化維持培養しました。未分化/分化状態に特徴的なマーカー候補成分を探索するために、サイトカインや低分子化合物などの液性因子を表1記載の培養条件に添加し、各胚葉系への分化誘導刺激を加えました。各培養系に対して24時間毎に全量培地交換を行い、使用済み培養上清を回収し測定サンプルとしました。

回収した培養上清はC2MAPに供し、表2に記載された95成分について一斉分析を行いました。

その後、C2MAP TRENDS、マルチオミックス解析パッケージをそれぞれ用いてデータ解析を実施し、サンプル間で有意な差のある成分を探索しました。

表 1 培養条件

細胞株	ヒトiPS細胞(PFX#9株)
培地	TeSR-E8™
足場材	Vitronectin-N™
初期播種量	1 × 10 ⁵ cells/well
プレート種類	6well plate

培養上清サンプルおよびデータは公益財団法人 神戸医療産業都市推進機構 川真田先生よりご提供いただきました。

表 2 登録化合物一覧

No.	化合物名	分類	No.	化合物名	分類	No.	化合物名	分類
IS	2-Isopropylmalic acid	標準物質	32	N-Acetylaspartic acid	アミノ酸	64	Cytidine	核酸関連
1	Gluconic acid	糖	33	N-Acetylcysteine	アミノ酸	65	Cytidine monophosphate	核酸関連
2	Glucosamine	糖	34	Ornithine	アミノ酸	66	Deoxycytidine	核酸関連
3	Hexose (Glucose)	糖	35	Oxidized glutathione	アミノ酸	67	Guanine	核酸関連
4	Sucrose	糖	36	Phenylalanine	アミノ酸	68	Guanosine	核酸関連
5	Threonic acid	糖	37	Pipecolic acid	アミノ酸	69	Guanosine monophosphate	核酸関連
6	2-Amino adipic acid	アミノ酸	38	Proline	アミノ酸	70	Hypoxanthine	核酸関連
7	4-Aminobutyric acid	アミノ酸	39	Serine	アミノ酸	71	Inosine	核酸関連
8	4-Hydroxyproline	アミノ酸	40	Threonine	アミノ酸	72	Thymidine	核酸関連
9	5-Glutamylcysteine	アミノ酸	41	Tryptophan	アミノ酸	73	Thymine	核酸関連
10	5-Oxoproline	アミノ酸	42	Tyrosine	アミノ酸	74	Uracil	核酸関連
11	Alanine	アミノ酸	43	Valine	アミノ酸	75	Uric acid	核酸関連
12	Alanyl-glutamine	アミノ酸	44	4-Aminobenzoic acid	ビタミン	76	Uridine	核酸関連
13	Arginine	アミノ酸	45	Ascorbic acid	ビタミン	77	Xanthine	核酸関連
14	Asparagine	アミノ酸	46	Ascorbic acid 2-phosphate	ビタミン	78	Xanthosine	核酸関連
15	Aspartic acid	アミノ酸	47	Biotin	ビタミン	79	Penicillin G	抗生物質
16	Citrulline	アミノ酸	48	Choline	ビタミン	80	2-Aminoethanol	その他
17	Cystathionine	アミノ酸	49	Cyanocobalamin	ビタミン	81	2-Ketoisovaleric acid	その他
18	Cysteine	アミノ酸	50	Ergocalciferol	ビタミン	82	3-Methyl-2-oxovaleric acid	その他
19	Cystine	アミノ酸	51	Folic acid	ビタミン	83	4-Hydroxyphenyllactic acid	その他
20	Glutamic acid	アミノ酸	52	Folinic acid	ビタミン	84	Citric acid	その他
21	Glutamine	アミノ酸	53	Lipoic acid	ビタミン	85	Ethylenediamine	その他
22	Glutathione	アミノ酸	54	Niacinamide	ビタミン	86	Fumaric acid	その他
23	Glycine	アミノ酸	55	Nicotinic acid	ビタミン	87	Glyceric acid	その他
24	Glycyl-glutamine	アミノ酸	56	Pantothenic acid	ビタミン	88	Histamine	その他
25	Histidine	アミノ酸	57	Pyridoxal	ビタミン	89	Isocitric acid	その他
26	Isoleucine	アミノ酸	58	Pyridoxine	ビタミン	90	Lactic acid	その他
27	Kynurenine	アミノ酸	59	Riboflavin	ビタミン	91	Malic acid	その他
28	Leucine	アミノ酸	60	Tocopherol acetate	ビタミン	92	O-Phosphoethanolamine	その他
29	Lysine	アミノ酸	61	Adenine	核酸関連	93	Putrescine	その他
30	Methionine	アミノ酸	62	Adenosine	核酸関連	94	Pyruvic acid	その他
31	Methionine sulfoxide	アミノ酸	63	Adenosine monophosphate	核酸関連	95	Succinic acid	その他

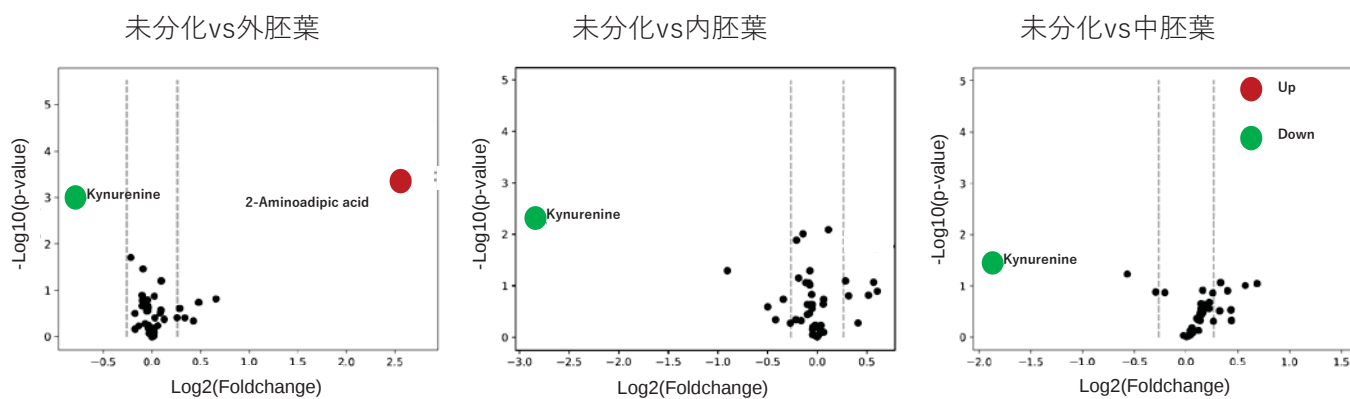


図1 Volcano Plot

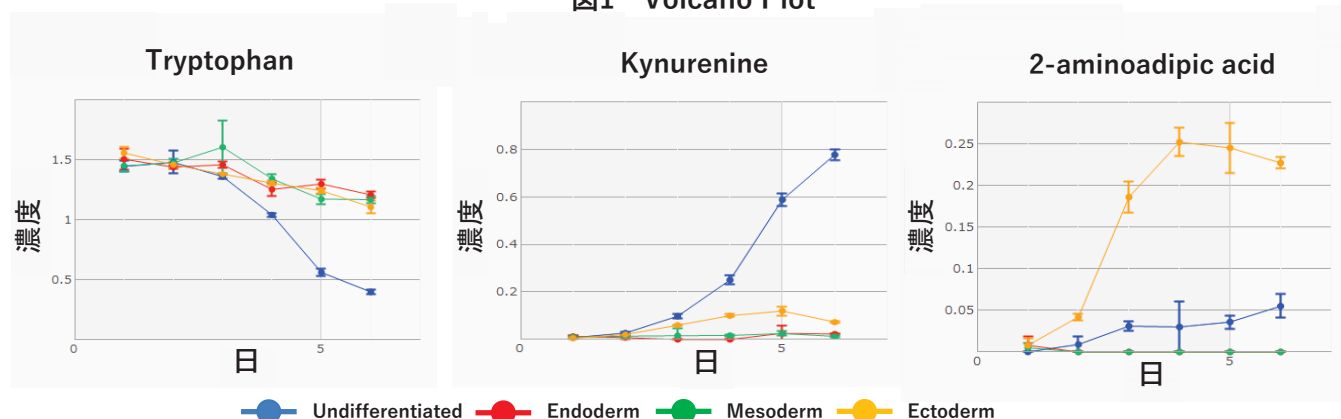


図 2 培養経過に伴うマーカー候補成分の経時変化

■結果

＜培養上清中のマーカー候補成分探索＞

C2MAPによる培養上清の多成分一斉分析の結果、95成分のうち55成分を検出することが出来ました。培養開始後、早期に分化状態を判定可能なマーカー成分を探索するために、培養3日目における各成分の面積比をVolcano Plotに供し、未分化iPS細胞と各胚葉系に分化誘導したiPS細胞の2群間比較を実施しました(図1)。その結果、未分化iPS細胞の培養上清ではKynurenineが特異的に強く検出されました。また、外胚葉分化細胞の培養上清では2-Aminoadipic acidが特異的に強く検出されました。

上記化合物を含む2群間で差が認められた成分について、外部標準法で定量を行い、培養経過に伴う経時変化をプロットしました(図2)。その結果、未分化iPS細胞の培養上清では、培養経過に伴いTryptophanが消費され、その代謝産物であるKynurenineの分泌量が増加していることが示されました。また、外胚葉分化細胞の培養上清では、培養経過に伴い2-Aminoadipic acidの濃度が増加していることが示されました。なお、標準添加法で得られたデータにおいても、経時変化のパターンは図2と同様であったことから、得られたグラフは実際の培養上清の濃度変動を表していることが示されました(表3)。

＜未分化iPS細胞におけるKynurenineの役割＞

未分化マーカー候補として同定されたKynurenineの役割を調べるため、Kynurenineの代謝系に着目しました。TryptophanからKynurenineの代謝酵素であるIDO1の阻害剤を培地中に添加して未分化維持培養を行ったところ、細胞増殖が抑制されることを確認しました(図3)。また、培養上清分析の結果、IDO1阻害剤の添加によってKynurenineの生成が抑制されることを確認しました(図4)。よって、未分化iPS細胞の増殖にはKynurenineが重要な役割を果たしていることが示唆されました。

表3 Day4における濃度値

化合物名	濃度値 (外部標準法)	濃度値 (標準添加法)
Kynurenine	0.22 μ M	0.23 μ M
2-Aminoadipic acid	0.25 μ M	0.19 μ M
Tryptophan	0.90 μ M	1.05 μ M

※Kynurenine・Tryptophanは未分化維持培養サンプルの測定値、
2-Aminoadipic acidは外胚葉分化サンプルの測定値

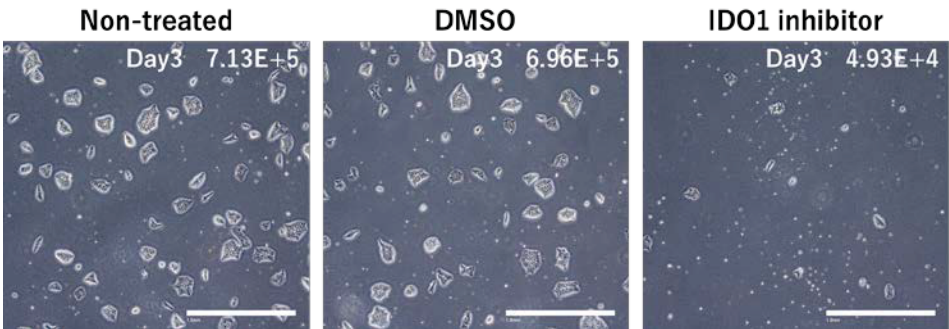


図3 顕微鏡画像

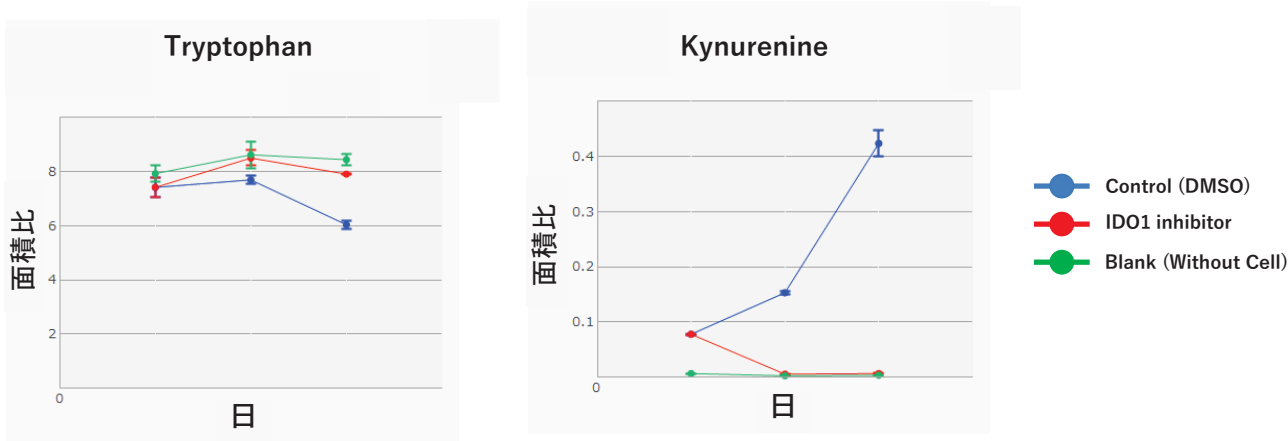


図4 培養経過に伴うTryptophan, Kynurenineの経時変化

Kynurenineは芳香族炭化水素受容体(AHR)と結合して複合体(Kyn-AHR)を形成し、核内に輸送された後に一部の遺伝子発現を上昇させることが知られています。未分化iPS細胞におけるKyn-AHR複合体の働きを調べるため、AHRアンタゴニストを培地中に添加して未分化維持培養を行いました。その結果、AHRアンタゴニストの添加によって細胞増殖が抑制されること(図5)、Kynurenineの生成が抑制されることを確認しました(図6)。また、クロマチン免疫沈降-定量PCR法によって、Kyn-AHR複合体は未分化維持・自己複製に関わる転写因子(*POU5F1*、*NANOG*、*EP300*)およびAHR、*IDO1*の発現量を上昇させることを確認しました。

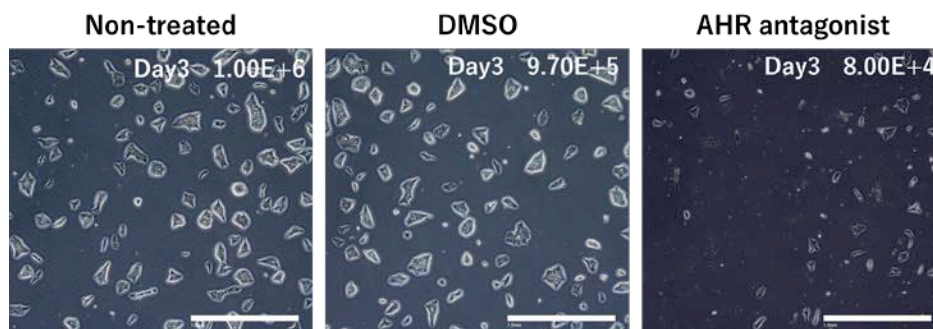


図5 顕微鏡画像

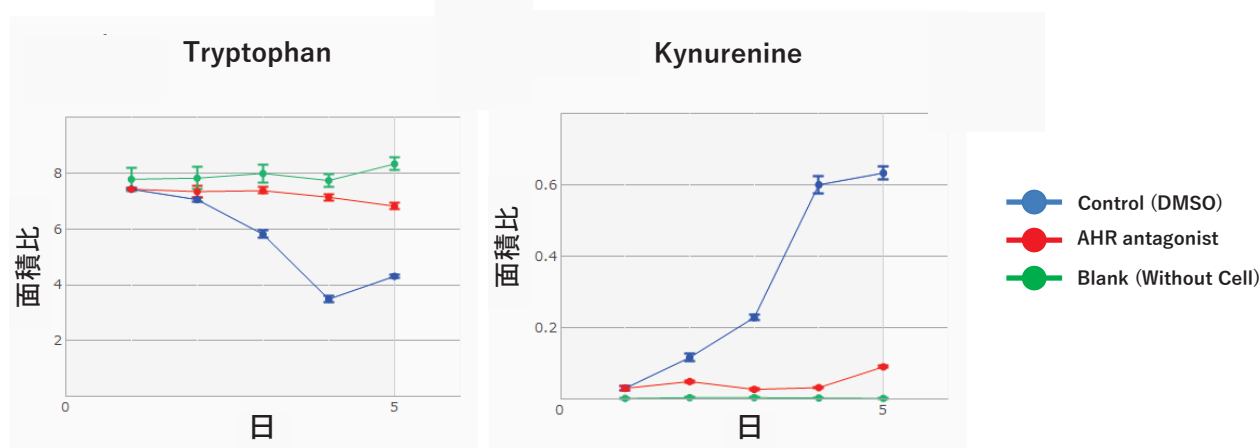


図6 培養経過に伴うTryptophan, Kynurenineの経時変化

<外胚葉分化細胞における2-Aminoadipic acidの代謝系>

外胚葉分化マーカー候補として同定された2-Aminoadipic acidについても、代謝系に着目することでその役割を調べました。2-Aminoadipic acidの生成経路は、Lysineの代謝とKynurenineの代謝の2経路が考えられます。未分化iPS細胞と外胚葉分化細胞の比較において、Lysine消費の経時変化に差は認められなかった(図7)ことから、2-Aminoadipic acidは主にKynurenineの代謝経路から生成されていると推察しました。

上述の代謝酵素群の一つである、KAT2の阻害剤を培地中に添加して外胚葉分化誘導刺激を加えました。その結果、KAT2阻害剤の添加によって2-Aminoadipic acidの生成が抑制されること(図7)、外胚葉への分化がある程度抑制されていることが観察されました(図8)。よって、分化誘導刺激により、未分化維持に重要な役割を果たすKynurenineの分解経路が活性化し、Kynurenineの分解に伴って2-Aminoadipic acidが生成されることが示唆されました。

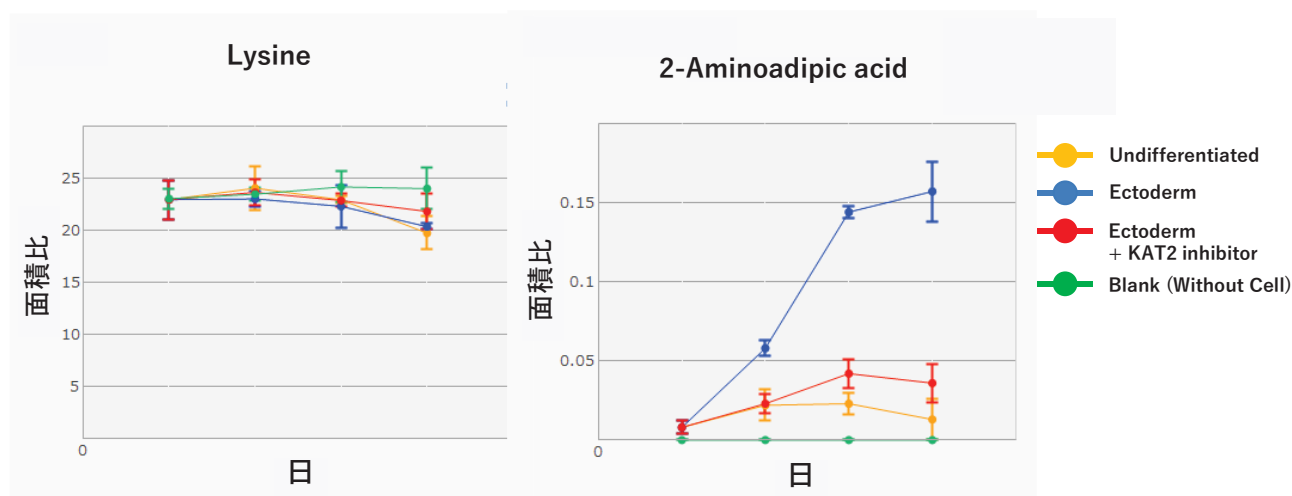


図7 培養経過に伴うLysine, 2-Aminoadipic acidの経時変化

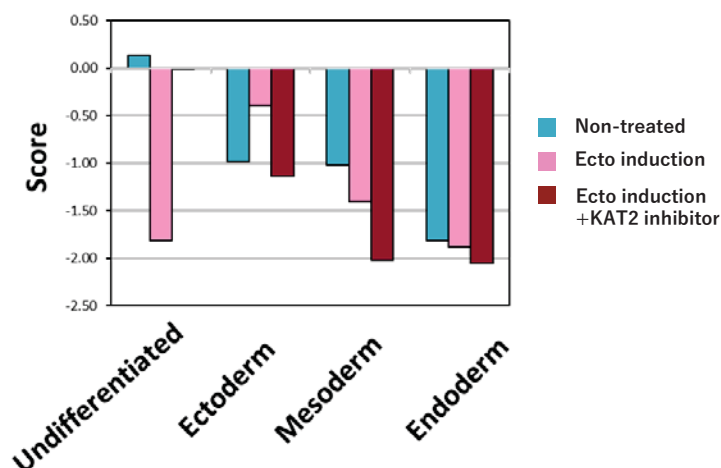


図8 遺伝子発現解析結果

<未分化維持と分化誘導開始の作用機序>

これまで得られた結果を総合すると、未分化iPS細胞において、Tryptophanから生成したKynurenineは、細胞質中でAHRと結合することでKyn-AHR複合体を形成します。Kyn-AHR複合体は核内に移行し、未分化維持や自己複製に関わる転写因子の発現量を上昇させます。同時に、Kyn-AHR複合体はAHR、IDO1の発現量も上昇させることで、上述の経路をより強固にし、未分化状態を維持します。また、余剰のKynurenineは培養液中に分泌されることで、Kynurenineを介した未分化維持ループを持続的に活性化しています。一方で、外胚葉分化誘導刺激が加わると、KAT2を含むKynurenine代謝に関わる酵素群の発現量が上昇し、細胞中のKynurenineが代謝され、2-Amino adipic acidが生成します。Kynurenine濃度の低下により、Kynurenineを介した未分化維持ループが機能しなくなり細胞は未分化状態から外胚葉への分化誘導を開始します（図9）。

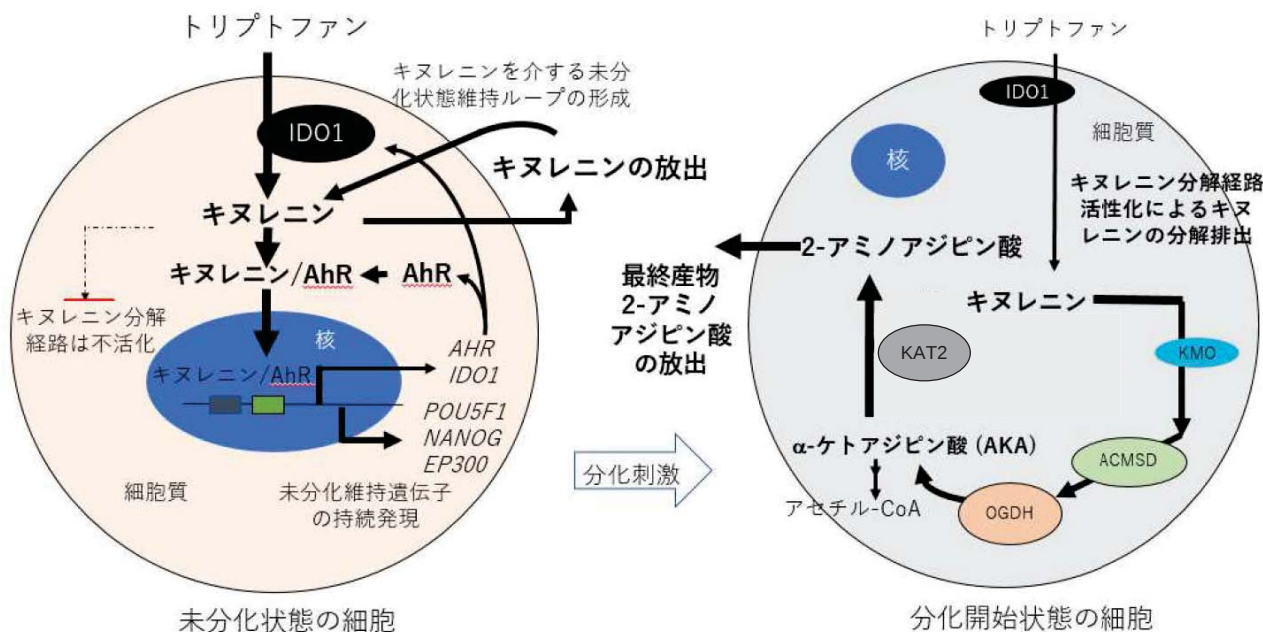


図9 Kynurenine、2-Amino adipic acidの代謝経路と遺伝子発現の相関図

■ 結論

C2MAPによる培養上清の多成分一斉分析によって、未分化iPS細胞・外胚葉分化細胞において特徴的な変動を示すマーカー成分としてKynurenine、2-Amino adipic acidをそれぞれ同定しました。同定されたマーカー成分は、細胞の未分化/外胚葉分化状態に密接に関連する因子であることが示されました。よって、本システムを用いることで細胞非侵襲的に細胞の状態を評価可能であることが示されました。

参考文献

- 1) T. Yamamoto, K. Hatabayashi, M. Arita, N. Yajima, C. Takenaka, T. Suzuki, M. Takahashi, Y. Oshima, K. Hara, K. Kagawa, S. Kawamata : Kynurenine signaling through the aryl hydrocarbon receptor maintains the undifferentiated state of human embryonic stem cells, Sci. Signal. 12, eaaw3306 (2019).

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器として承認を受けておりません。治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2020年1月

島津コールセンター ☎ 0120-131691
(075)813-1691