

iPS 細胞と元素周期表の密接な関係

桜井 都衣*・藤 渕 航*

1. はじめに

現代の再生医療を支える重要なツールに細胞がある。特に2007年にヒトのiPS細胞が発見されて以降¹⁾、その樹立や応用法に関する研究が活発に行われており、実際に人工細胞由来の人工組織が医療の現場で活用されるという時代の到来が現実味を帯びて来ている²⁾。それと同時にその安全性の評価と品質管理のため、基準となる個々のヒト体細胞についての知識と品質管理の必要性が著しく高まっている。現在は1細胞レベルでの生物の持つシステムの網羅的かつ様々な分子解析(オミクス解析)技術が盛んに開発され、ヒトの体を構成する細胞の有する膨大な情報を元に、培養による人工器官(オルガノイド)形成^{3,4)}だけでなく3Dプリンター等の革新的技術を用いた人工臓器の作製等も行われている⁵⁾。しかしながら上述のような研究や開発は、ヒトの体がどのような規律の元にその形態を形成し、生命維持や高次機能発現を行っているのかという謎を追求するものであり、未だに解明されていないのが現状であるためその進行状況は思わしくない。この問題を解決するアプローチの一つとして、まずヒトの体を構成する細胞の種類やその性質を入念に調べ上げ、遺伝子発現パターンや機能の類似性を始めとした様々なパラメータに沿って並べていく、いわば元素周期表なものを作成していく必要があるのではないか、と考えられる。細胞の規律周期表を作成するという大きな目標のもと、我々の



図1. ヒト細胞情報統合データベース SHOGoiN トップページ

研究室では多様な細胞情報を収集・格納、そして検索を可能とするデータベース構築に取り組んでいる。そこで本稿では、当研究室で開発中のヒト細胞データベース SHOGoiN (図1)に格納される情報を中心として、上述のような最新の再生医療研究を安全で効果的に遂行するために重要と考えられる細胞情報を紹介する。

2. 細胞は生物を構成する最小の機能単位である

従来の約250種類存在すると言われているヒトの細胞は、その形態や機能に基づいて分類が行われてきた。しかし実際のヒトの成体は約60兆個の細胞によって構成されることが知ら

*京都大学 iPS 細胞研究所 増殖分化機構研究部門

第296回京都化学者クラブ例会(平成27年2月7日)講演

れており、我々の体が正確に構築されるためには正確に分化した細胞が、正確な場所に局在する必要がある。加えてそれぞれの細胞がその種類によって、また取り巻く周囲の複雑な分子環境を敏感に感じ取ることで、それぞれの役割を正確に果たしている。近年では、造血幹細胞や神経幹細胞の様に多分化能を持つ細胞で1細胞由来の増殖細胞から得た細胞を調べると、個々の細胞はそれぞれ異なる遺伝子発現状態にあり(異種性)、その違いが後の細胞種の運命決定に大きく寄与するという報告が多数得られている^{6,7)}。このことから、特に発達過程の細胞はその遺伝子発現状態や周囲の環境によって影響を受けやすく、その性質が多様であることがわかる。現代のように、iPS細胞を始めとした人工細胞や組織の医療応用の実現のためには、これらの個々の細胞に注目した、詳細な細胞の分類や情報解析が必要になると考えられる。例えば、単一の受精卵がどのようにして多様な細胞種に発生・分化し、高次で複雑な機能を持つ成体を構成するのかを追求する研究や、また、体内の様々な部位で観察される繊維芽細胞の様な遍在性の細胞は、体内の異なる部位に局在しているものであったとしても本当に同一の細胞種として分類できるのだろうか、ということを実験的に調べる必要がある。少なくともこれらの疑問に答え、細胞の性質を詳細に定義することが、これからの再生医療にとって非常に重要だと考えられる。そこで当研究室ではまず、ヒトの体を構成する細胞種と解剖学的な位置情報に基づいた分類を試みた。その結果、例えば上述にある繊維芽細胞や、また上皮細胞、平滑筋細胞などの細胞種に関しても局在部位ごとに別の細胞として分類することが可能となった。更に現在では解剖学的位置に加え、分化系譜(三胚葉由来もしくは無胚葉性か)、分化能、そし

てその細胞が体内に存在する時期(ステージ)という情報の付加も試みている。この方法を用いて分類された細胞は現在までに約2,100種類にもおぼろげに、更にこれらの細胞は分類に用いた情報を加味したIDを割り当てられ、体系的な管理が可能になると考えられる。また解剖学的位置情報の付加によって、各組織や器官を構成する細胞種の組み合わせも明らかにすることができた。

興味深いことに、細胞の詳細な分類を行うに従って、細胞は事物を構成する成分の基本単位である元素と概念的に共通な考え方ができることに気が付く。例えば、表1に示すように、各元素にはそれぞれ同位体のような状態の異なる存在があり、細胞には免疫細胞に代表されるように同一細胞でも活性型などの状態の異なるものが存在する。また、特定の条件環境下における元素転換や細胞間の種転換が起こり得る点、元素単体及び単一細胞で存在(培養)する際の安定性が元素の種類・細胞の種類によって異なる点、元素及び細胞は性質や機能の類似性を加味した分類が可能となる点、最後に、元素の組み合わせによって化合物が形成されて特性が決まり、細胞種はその集合によってある機能特性を有した組織・器官が構築されるという点がよく類似している。しかしながら、存在可能な元素の数が173と推定できるのに対して、これまで約

表1. 元素及び細胞に見られる共通点

| | 元素 | 細胞 |
|--------|-----------|-----------|
| 状態 | 多様性あり | 多様性あり |
| 転換能 | あり | あり |
| 安定性 | 多様性あり | 多様性あり |
| 性質類似性 | あり | あり |
| 複合体形成 | あり(化合物) | あり(組織・器官) |
| 存在可能個数 | 173元素(推定) | 未知 |
| 周期表 | あり | なし |

250 といわれていた細胞種の数で多様な研究が行われるに従って“未知”とされる点、及び元素にはその周期律に従った配列を行い周期表が作成されているが、細胞に関してはまだその周期律が明らかにされていないため、詳細な分類表（周期表）の作成が不可である、という相違点もある。この相違点に関しては、細胞の研究が進むことによって解決されるものであり、現在の課題として精力的に取り組まれている。

3. 細胞を定義するために重要な情報とは

前項でも述べた通り、細胞の性質や機能を元にした詳細な分類（定義）を行うことが今後の再生医療の発展においてとても重要である。それでは、細胞の性質の定義を行うためにはどのような情報が必要になるのであろうか。

表2に、細胞の有する内部情報とその解析技術の例を挙げる。まず最も一般的かつ重要な情報としてあげられるのが、ゲノム情報を始めとした遺伝子発現情報だろう。その中でも、網羅的に mRNA 量を測定するトランスクリプトーム解析や網羅的に DNA メチルシトシン部位を同定するメチローム解析（エピゲノム解析の一

種）は現在最もよく用いられている解析方法であると言える。また、細胞種を決定する根拠となるマーカー分子の発現量やその局在解析情報もよく調べられており、これらの分子の正しい発現は細胞の機能に直接リンクすると考えられる。更に、細胞自身や細胞内構造の形態情報も非常に重要な指標となり、マーカー分子の発現情報と同様に細胞（特に神経細胞などの極性を持つ構造の細胞種など）の機能レベルでの解析対象としてよく観察されている。しかしながら、現在の時点で細胞を定義するための‘最低限の情報’というものは明確には定められていない。従って表2にあるような技術のどれか1種類の解析だけでも行えば十分というわけではなく、組み合わせで詳細な解析を行うことが重要である。また、細胞はエピジェネティックな分子発現の変化においても見られるように、周囲環境によっても性質や機能が変化するため、解析の際に細胞の採取やサンプル調製に用いた条件の詳細な記述も重要となる。

更に現在は著しいテクノロジーの発展により、表2に示した技術のうち多くは、既に1細胞解析技術を取り込んだハイスループットな解析方法が確立されている⁸⁻¹²⁾。それによって、これ

表2. 細胞機能解析に用いられる手法の一例

| 細胞内部情報解析 | 解析技術 | 1細胞化 |
|--------------|-----------------------|------|
| ゲノム解析 | ゲノムシーケンシング | ◎ |
| エピゲノム解析 | マイクロアレイ | ◎ |
| | ChIP シーケンシング | ◎ |
| | メチル化シーケンシング | ◎ |
| トランスクリプトーム解析 | マイクロアレイ | ◎ |
| | RNA シーケンシング | ◎ |
| プロテオーム解析 | タンパク質マイクロアレイ | ◎ |
| | 液体クロマトグラフィー（タンデム）質量分析 | ◎ |
| | マスサイトメトリー | ◎ |
| インタラクトーム解析 | 液体クロマトグラフィー質量分析 | ◎ |
| | 蛍光共鳴エネルギー移動解析 | ◎ |
| メタボローム解析 | イメージング質量分析 | ◎ |
| フェノーム解析 | イメージング | ◎ |

までに一般的に行われてきたが細胞の集団レベルでの解析では不可能であった、より解像度の高い個々の細胞の遺伝子発現状態を定量的に解析し、それに伴う細胞分化状態、そして分化後の細胞による機能発現の正確な情報を得ることが可能となっている。

4. 近年の技術で可能になったこと：細胞の自動分類法と新たなサブクラスの発見

近年の1細胞解析技術を用いた研究の成果として、細胞の網羅的な遺伝子発現情報とコンピュータアルゴリズムを用いて行った詳細な分類が挙げられる。まず、Jaitin et al.¹²⁾ではマウス脾臓からの4,000細胞という膨大な量の細胞を用い、各細胞のトランスクリプトーム解析情報と分類用アルゴリズムによる細胞の分類を行った。脾臓という組織には多種の免疫系細胞が含まれており、従来の手法であれば脾臓由来細胞をまずフローサイトメトリーという手法を用いて前もって各細胞種への分類を行い、目的とする細胞種を用いて遺伝子解析を行う。しかしながら、Jaitinらはそれぞれの脾臓細胞をフローサイトメトリーにかけることなく、遺伝子情報のみで分類を行うことに成功した。またUsoskin et al.¹³⁾では、マウス後根神経節に局在する5種の感覚系（機械受容性、反射性、温度感受性、痒み感受性、痛感受性）を司る662の神経細胞をサンプルとしてトランスクリプトーム解析による細胞の分類を行った。その結果、各感覚神経は5種感覚系の感覚系サブクラスを含む11クラスへ分類できることが明らかになった。更に、Rinkevich et al.¹⁴⁾では、マウスを用いて体幹背部と口内から得た‘皮膚線維芽細胞’と呼ばれる細胞をサンプルとしてそれぞれの遺伝子発現解析を行ったところ、これらの細胞は異なる系譜由来の細胞であることが

明らかになった。このように、現在では1細胞レベルの遺伝子発現プロファイルを用いた精密で定量的な解析による分類が可能となり、その結果これまで細胞集団を用いて行われていた解析では明らかにされなかった細胞の種類が見出されるようになってきた。このような解析や情報を増やしていくことで、細胞同士の類似性や関係性の全貌が観察できるようになると考えられる。

5. おわりにー iPS細胞と元素周期表の密接な関係ー

著しい研究技術の発展とともに、これまで当然とされていた知識や概念が覆されるということが起こりうる時代になってきている。しかしながら、そういう中においても不変の事実も存在することは確かである。細胞に関しても同様に、微小な環境の変化によってその可変性を高めるが、細胞の有する内部情報を元に体系立てて分類することによって、受精から成熟までに出現する前駆細胞（細胞運命が決定されている終末分化前の細胞）等も含め全ての細胞の周期律が明らかになり、原子周期表の様な細胞の周期表ができるだろう。当研究室で構築中であるヒト細胞情報データベース SHOGoiNは、その元となる情報を網羅的に集めるためのプラットフォームとしての役割を果たしている。また当研究室において、ヒト細胞種及び組織からの約3,000種類のサンプルをマイクロアレイで解析することにより得た遺伝子発現プロファイルをヒートマップ化し分類を試みたところ、組織やその構成細胞の種類による類似性など、一定のパターンが観察された（図2）。上記の結果は細胞集団サンプルを用いた解析によるものだが、今後は1細胞解析データを用いた同様のアプローチを試みる必要がある。

SOM of SOM (2,919 Tissues)

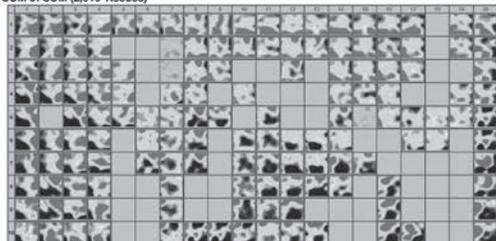


図2. ヒト細胞種及び組織の遺伝子発現プロファイルのヒートマップによる分類

しかし、現在の技術では1細胞解析を行う際に、取得可能なサンプル量や技術的な問題からトランスクリプトーム解析とエピゲノム解析（マルチオミクス解析）などを同時に行うことが困難である点、1細胞解析データの解析アルゴリズム開発が十分に進んでいない点、またハイスループットで解析可能なサンプル数の上限やコストにおける問題もあり、生物個体レベルの解析が困難である点が課題として挙げられる。複数の個体からの情報を寄せ集めるのではなく、単一個体の全構成細胞を一気に解析し多様な情報が得られれば、これまでにまだその存在が明らかにされていない未知細胞の発見や、前述の、単一の受精卵がどのようにして多様な細胞種に発生・分化し、高次で複雑な機能を持つ成体を構成するのかという謎の解明に近づくことが可能になると考えられる。

現在行われている細胞解析研究が更に進むと細胞情報の標準化へとつながり、その情報を活用することによるiPS細胞を始めとしたあらゆるヒト体細胞の人工的なしかもより効率の良い作製が可能となるだろう。またそれと同時に、作製された人工細胞の品質評価用情報としても用いられることが期待される。移植用臓器や細胞の作製だけではなく、現在ではiPS細胞は完治困難とされているガンの様な疾患の治療にも様々な形で用いられ始めており^{16,17)}、人工細胞

の医療における有用性は計り知れないということを実感させる。その有用性を最大限に引き出すためにも、細胞の有する普遍的な情報の集大成と考えられる細胞規律周期表の作製は必要不可欠であり、それが完成した暁には医学分野のみならずライフサイエンス分野全体の発展の促進につながることを期待される。

6. 謝辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金研究「ヒト幹細胞を用いた再生医療の臨床実用化のための基盤構築に関する研究（H25-実用化（再生）-指定-001）、iPS細胞研究基金・H27コアプロジェクト「ヒト三次元組織のインシリコ再構築のための1細胞統合解析技術」の支援により行いました。

7. 参考文献

- 1) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, and Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, **131**: 861-872 (2007)
- 2) Reardon S and Cyranoski D. Japan stem-cell trial stirs envy. *Nature*, **513**: 287-288 (2014)
- 3) Willyard C. The boom in mini stomachs, brains, breasts, kidneys and more. *Nature*, **523**: 520-522 (2015)
- 4) Takebe T, Enomura M, Yoshizawa E, Kimura M, Koike H, Ueno Y, Matsuzaki T, Yamazaki T, Toyohara T, Osafune K, Nakauchi H, Yoshikawa HY, and Taniguchi H. Vascularized and Complex Organ Buds from Diverse Tissues via Mesenchymal Cell-Driven Condensation.

- Cell Stem Cell*, **16**: 556–565 (2015)
- 5) Murphy SV and Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnol.* **32**: 773–785 (2014)
 - 6) Chang HH, Hemberg M, Barahona M, Ingber DE, Huang S. Transcriptome-wide noise controls lineage choice in mammalian progenitor cells. *Nature*, **453**: 544–547 (2008)
 - 7) Johnson MB, Wang PP, Atabay KD, Murphy EA, Doan RN, Hecht JL, and Walsh CA. Single-cell analysis reveals transcriptional heterogeneity of neural progenitors in human cortex. *Nat Neurosci*, **18**: 637–646 (2015)
 - 8) Tang F, Barbacioru C, Wang Y, Nordman E, Lee C, Xu N, Wang X, Bodeau J, Tuch BB, Siddiqui A, Lao K, and Surani MA. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat. Methods*, **6**: 377–382 (2009)
 - 9) Islam S, Kjällquist U, Moliner A, Zajac P, Fan JB, Lönnerberg P, and Linnarsson S. Highly multiplexed and strand-specific single-cell RNA 5' end sequencing. *Nat Protoc.* **7**: 813–828 (2012)
 - 10) Guo H, Zhu P, Guo F, Li X, Wu X, Fan X, Wen L, and Tang F. Profiling DNA methylome landscapes of mammalian cells with single-cell reduced-representation bisulfite sequencing. *Nat Protoc*, **10**: 645–659 (2015)
 - 11) Bendall SC, Simonds EF, Qiu P, Amir el-AD, Krutzik PO, Finck R, Bruggner RV, Melamed R, Trejo A, Ornatsky OI, Balderas RS, Plevritis SK, Sachs K, Pe'er D, Tanner SD, and Nolan GP. Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. *Science*, **332**: 687–696 (2011)
 - 12) Li H, Smith BK, Shrestha B, Márk L, and Vertes A. Automated cell-by-cell tissue imaging and single-cell analysis for targeted morphologies by laser ablation electrospray ionization mass spectrometry. *Methods Mol Biol.* **1203**: 117–27 (2015)
 - 13) Jaitin DA, Kenigsberg E, Keren-Shaul H, Elefant N, Paul F, Zaretsky I, Mildner A, Cohen N, Jung S, Tanay A, and Amit I. Massively parallel single-cell RNA-seq for marker-free decomposition of tissues into cell types. *Science*, **343**: 776–779 (2014)
 - 14) Usoskin D, Furlan A, Islam S, Abdo H, Lönnerberg P, Lou D, Hjerling-Leffler J, Haeggström J, Kharchenko O, Kharchenko PV, Linnarsson S, and Ernfors P. Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nat Neurosci.* **18**: 145–153 (2015)
 - 15) Rinkevich Y, Walmsley GG, Hu MS, Maan ZN, Newman AM, Drukker M, Januszyn M, Krampitz GW, Gurtner GC, Lorenz HP, Weissman IL, and Longaker MT. Skin fibrosis. Identification and isolation of a dermal lineage with intrinsic fibrogenic potential. *Science*, **348**: aaa2151 (2015)
 - 16) Oshima N, Yamada Y, Nagayama S, Kawada K, Hasegawa S, Okabe H, Sakai Y, and Aoi T. Induction of cancer stem

cell properties in colon cancer cells by defined factors. *PLoS One*, **9**: e101735 (2014)

- 17) Ando M, Nishimura T, Yamazaki S, Yamaguchi T, Kawana-Tachikawa A, Hayama T, Nakauchi Y, Ando J, Ota Y, Takahashi S, Nishimura K, Ohtaka M8

Nakanishi M, Miles JJ, Burrows SR, Brenner MK, and Nakauchi H. A safeguard system for induced pluripotent stem cell-derived rejuvenated T cell therapy. *Stem Cell Reports*, **5**: 597-608 (2015)