

使用细胞培养基平台 C2MAP™ 进行人 iPS 细胞未分化性评价

K. Toyoda, H. Kuroda, T. Suzuki

关键词：iPS 细胞、代谢组学、非侵袭性评价方法

■ 主旨

使用细胞培养基平台 C2MAP 进行人 iPS 细胞的培养上清液分析，鉴定了未分化 / 分化状态的标志物成分。通过对鉴定的标志物成分进行监控，表明对细胞状态进行非侵袭性评价的可能性。

■ 背景

为了实现再生医疗的产业化，需要开展可以高品质、大量制备和供应细胞的技术开发工作。过去，对细胞状态进行评价的方法主要采用基因表达分析的方法，但是，上述方法具有细胞侵袭性，因此，一般作为培养结束后的评价方法使用。我们为了确立通过分析细胞培养上清液的成分对细胞状态进行非侵袭性评价的方法，开发了使用液相色谱 - 质谱联用分析仪 (LC-MS/MS) 的细胞培养基分析平台 C2MAP。

■ 细胞培养基分析平台 C2MAP™

细胞培养基分析平台 C2MAP 只要放置好培养上清液，就可以自动完成从样品的预处理到基于 LC-MS/MS 的 95 种成分的同时分析。另外，分别使用查看器软件 C2MAP TRENDS 和统计分析软件多组学分析软件包，可以简便地探索标志物候选成分。本次分别使用 C2MAP、C2MAP TRENDS 和多组学分析软件包，对是否可以评价人 iPS 细胞的未分化性进行了研究。

细胞培养基自动预处理装置
C2MAP-2030



液相质谱分析仪
LCMS-8060

细胞培养基分析平台
C2MAP™

查看器软件
C2MAP TRENDS



多组学分析软件包 (另售)



■ 实验方法

使用 TeSR-E8 对人 iPS 细胞进行了 6 天未分化维持培养。为了搜索未分化 / 分化状态的特征性标志物候选成分，按照表 1 所述的培养条件添加了细胞因子、低分子化合物等的液性因子，对各胚层系施加了分化诱导刺激。每隔 24 小时对各培养系进行培养基全量更换，回收已用的培养上清液，作为测定样品。

将回收的培养上清液放入 C2MAP 中，对表 2 所述的 95 种成分进行同时分析。

然后，分别使用 C2MAP TRENDS 和多组学分析软件包进行数据分析，探索样品间存在明显差异的成分。

表 1 培养条件

| | |
|-------|-------------------------------|
| 细胞株 | 人 iPS 细胞 (PFX#9 株) |
| 培养基 | TeSR-E8™ |
| 支架材料 | Vitronectin-N™ |
| 初期播种量 | 1 × 10 ⁵ cell/well |
| 样品板种类 | 6well plate |

培养上清液样品及数据由公益财团法人 神户医疗产业都市推进机构 川真田先生提供。

表 2 注册化合物一览

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

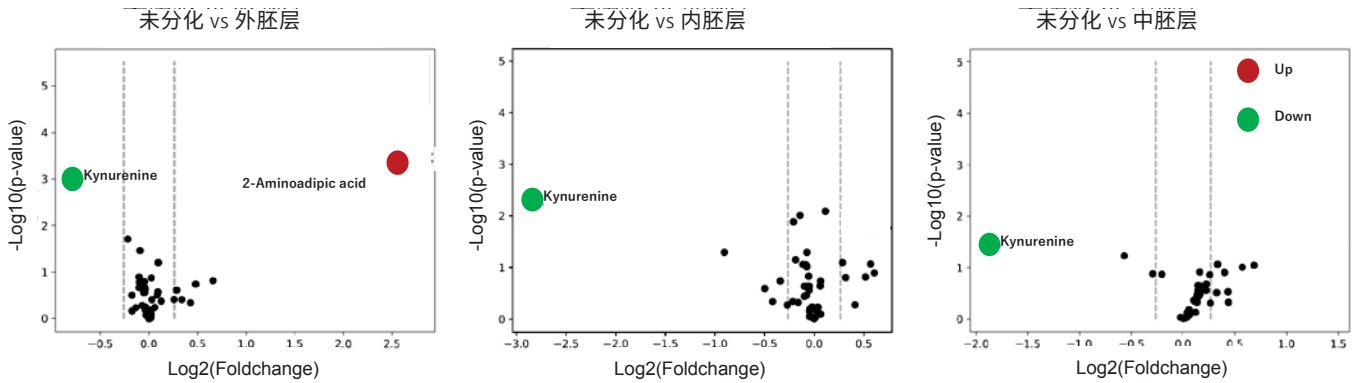


图 1 Volcano Plot

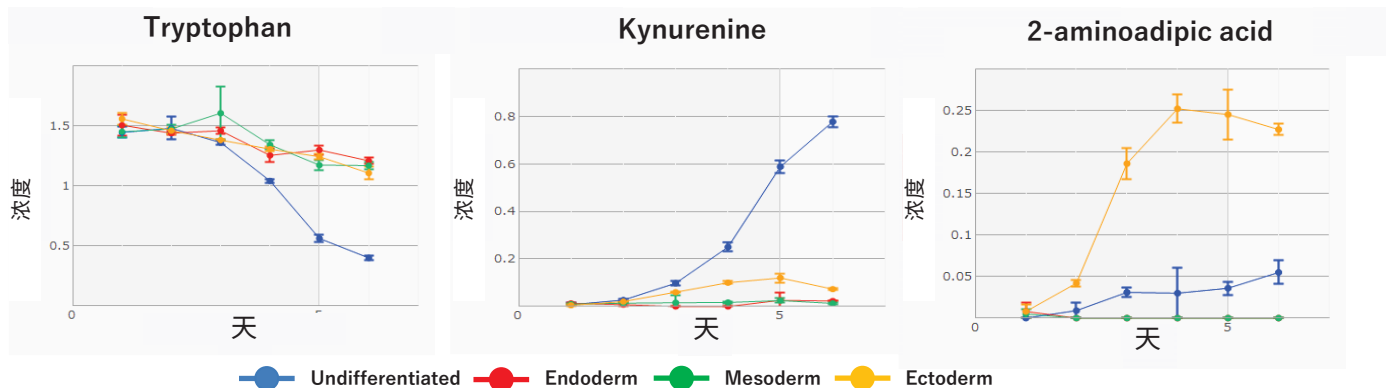


图 2 与培养过程相关的标志物候选成分时效变化

结果

< 培养上清液中的标志物候选成分探索 >

通过 C2MAP 进行培养上清液的多成分同时分析后，在 95 种成分中，检测到了 55 种成分。培养开始后，为了探索可以早期判定分化状态的标志物成分，将培养第 3 天的各成分面积比提供给 Volcano Plot，对未分化 iPS 细胞和在各胚层系中进行分化诱导的 iPS 细胞进行了组间比较（图 1）。结果发现，在未分化 iPS 细胞的培养上清液中明显检测到具有特异性的 Kynurenine。另外，在外胚层分化细胞的培养上清液中明显检测到了具有特异性的 2-Amino adipic acid。

关于包含上述化合物在内的两组间发现差异的成分，使用外标法进行定量，对与培养过程相关的时效变化绘制了图表（图 2）。从结果来看，在未分化 iPS 细胞的培养上清液中，Tryptophan 随着培养过程而被消耗，其代谢产物 Kynurenine 的分泌量增加。另外，在外胚层分化细胞的培养上清液中，2-Amino adipic acid 的浓度随着培养过程而增加。另外，在通过加标法得到的数据中，时效变化的形态和图 2 一样，因此，证实所得到的图表体现了培养上清液的实际浓度变化情况。

< Kynurenine 在未分化 iPS 细胞中的作用 >

为了调查作为未分化标志物候选成分而鉴定出的 Kynurenine 的作用，我们着眼于 Kynurenine 的代谢系统。通过在培养基中添加从 Tryptophan 代谢为 Kynurenine 的代谢酶 IDO1 的抑制剂，进行未分化维持培养，证明细胞增殖得到了抑制（图 3）。另外，通过培养上清液分析结果，证实了通过添加 IDO1 抑制剂，可以抑制 Kynurenine 的生成（图 4）。因此，这表明 Kynurenine 在未分化 iPS 细胞的增殖中起到了非常重要的作用。

表 3 Day4 的浓度值

| 化合物名称 | 浓度值(外标法) | 浓度值(加标法) |
|---------------------|--------------|--------------|
| Kynurenine | 0.22 μ M | 0.23 μ M |
| 2-Amino adipic acid | 0.25 μ M | 0.19 μ M |
| Tryptophan | 0.90 μ M | 1.05 μ M |

※Kynurenine-Tryptophan 是未分化维持培养样品的测定值，2-Amino adipic acid 是外胚层分化样品的测定值

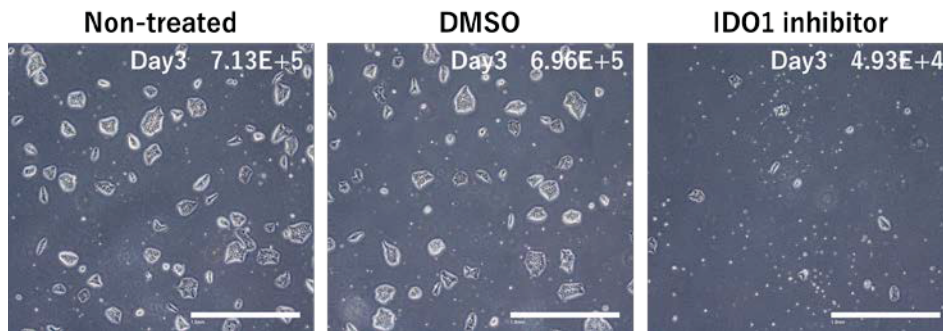


图 3 显微镜图像

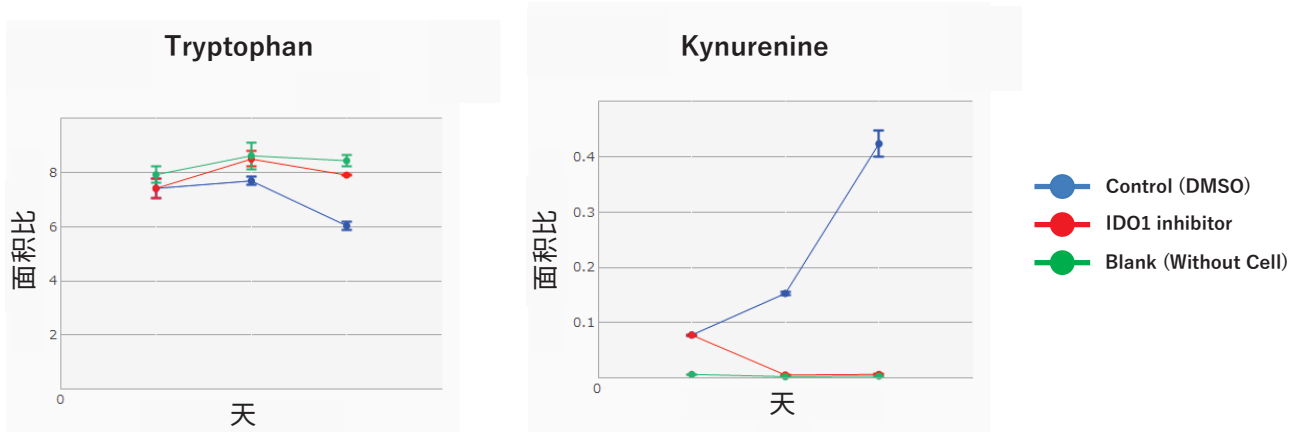


图 4 Tryptophan、Kynurenine 与培养过程相关的时效变化

现在已知，Kynurenine 与芳香烃受体 (AHR) 结合，形成复合体 (Kyn-AHR)，被输送到核内后，使部分基因表达上升。为了调查 Kyn-AHR 复合体在未分化 iPS 细胞中的作用，将 AHR 拮抗剂添加到培养基中，进行了未分化维持培养。结果证实，通过添加 AHR 拮抗剂，细胞增殖得到抑制 (图 5)，Kynurenine 的生成得到抑制 (图 6)。另外，通过染色质免疫沉淀一定量 PCR 法证实了 Kyn-AHR 复合体可以使维持未分化、与自我复制相关的转录因子 (*POU5F1*、*NANOG*、*EP300*) 以及 AHR、ID01 的表达量上升。

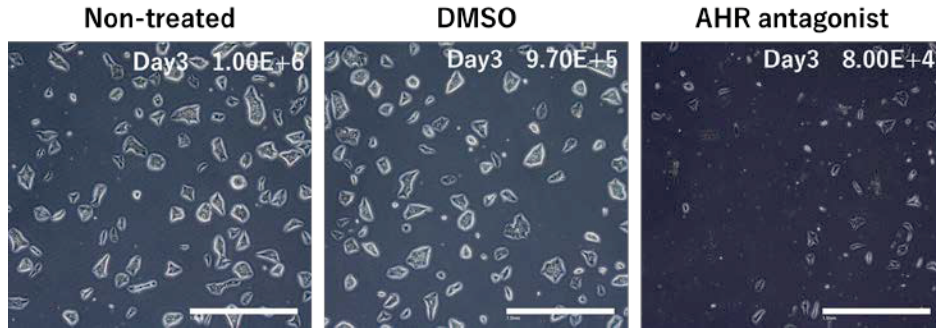


图 5 显微镜图像

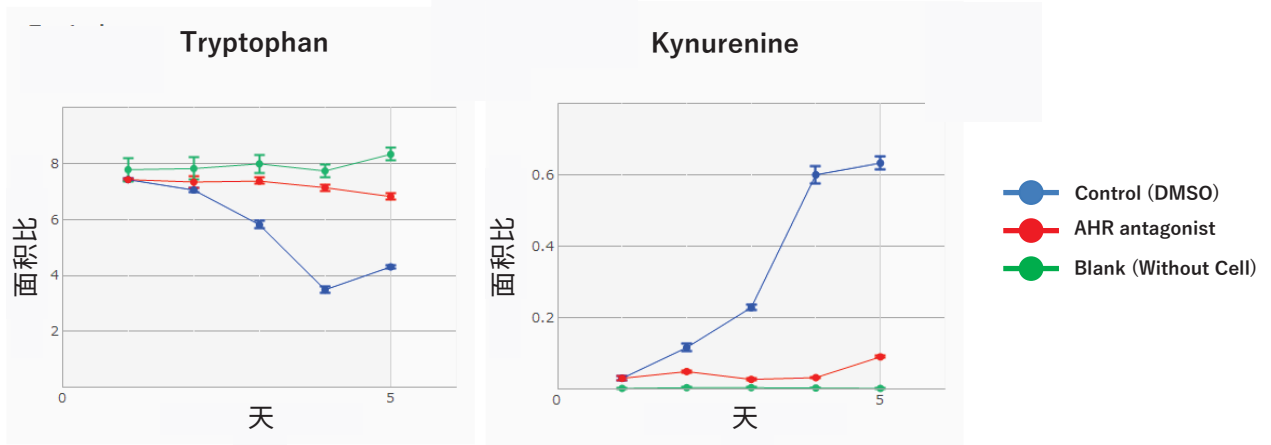


图 6 Tryptophan、Kynurenine 与培养过程相关的时效变化

<2-Aminoadipic acid 在外胚层分化细胞中的代谢系统 >

关于作为外胚层分化标志物候选成分而鉴定出的 2-Aminoadipic acid，我们也着眼于代谢系统，对其作用进行了调查。2-Aminoadipic acid 的生成路径应为 Lysine 的代谢和 Kynurenine 代谢的两种路径。与未分化 iPS 细胞与外胚层分化细胞的比较中，Lysine 的消耗未发现与时效变化相关的差异（图 7），因此，推测 2-Aminoadipic acid 主要由 Kynurenine 的代谢路径生成。

在培养基中添加 KAT2(上述代谢酶组之一)的抑制剂，施加外胚层分化诱导刺激。结果观察到通过添加 KAT2 抑制剂，2-Aminoadipic acid 的生成得到了抑制（图 7），对外胚层的分化在一定程度上得到了抑制（图 8）。因此，这表明通过分化诱导刺激，对维持未分化起到重要作用的 Kynurenine 的分解路径活性增强，随着 Kynurenine 的分解而生成了 2-Aminoadipic acid。

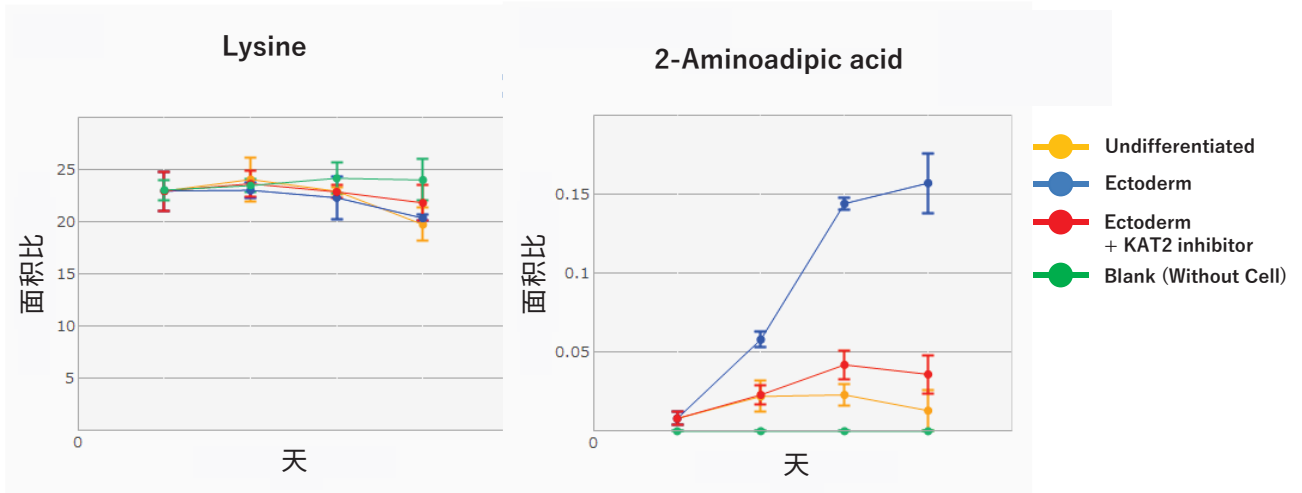


图 7 Lysine、2-Aminoadipic acid 与培养过程相关的时效变化

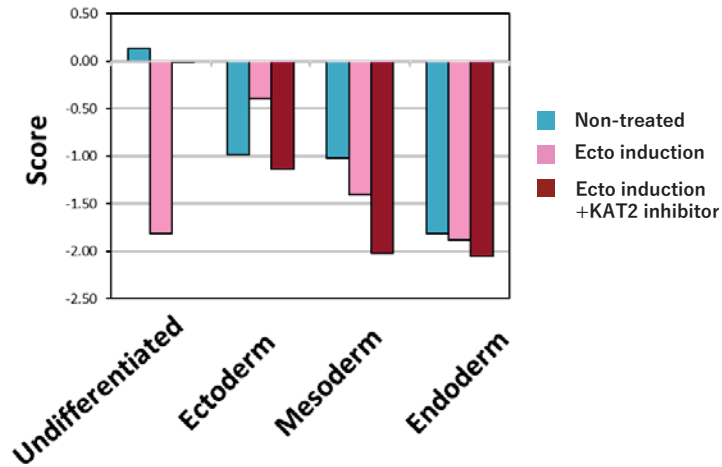


图 8 基因表达分析结果

< 维持未分化和开始诱导分化的作用机制 >

综合以上得到的结果, 在未分化 iPS 细胞中, 由 Tryptophan 生成的 Kynurenine 通过在细胞质中与 AHR 结合, 形成 Kyn-AHR 复合体。Kyn-AHR 复合体转移至核内, 使维持未分化和与自我复制相关的转录因子的表达量上升。同时, Kyn-AHR 复合体通过使 AHR、IDO1 的表达量上升, 让上述路径更加稳固, 维持未分化状态。另外, 剩余的 Kynurenine 在培养液中被分泌, 通过 Kynurenine 持续保持未分化维持环的活性。另一方面, 在施加外胚层诱导刺激后, 包括 KAT2 在内的与 Kynurenine 相关的酶组表达量上升, 细胞中的 Kynurenine 被代谢, 生成 2-Aminoadipic acid。由于 Kynurenine 浓度下降, 通过 Kynurenine 保持的未分化维持环不再发生作用, 从未分化状态开始向外胚层进行分化诱导 (图 9)。

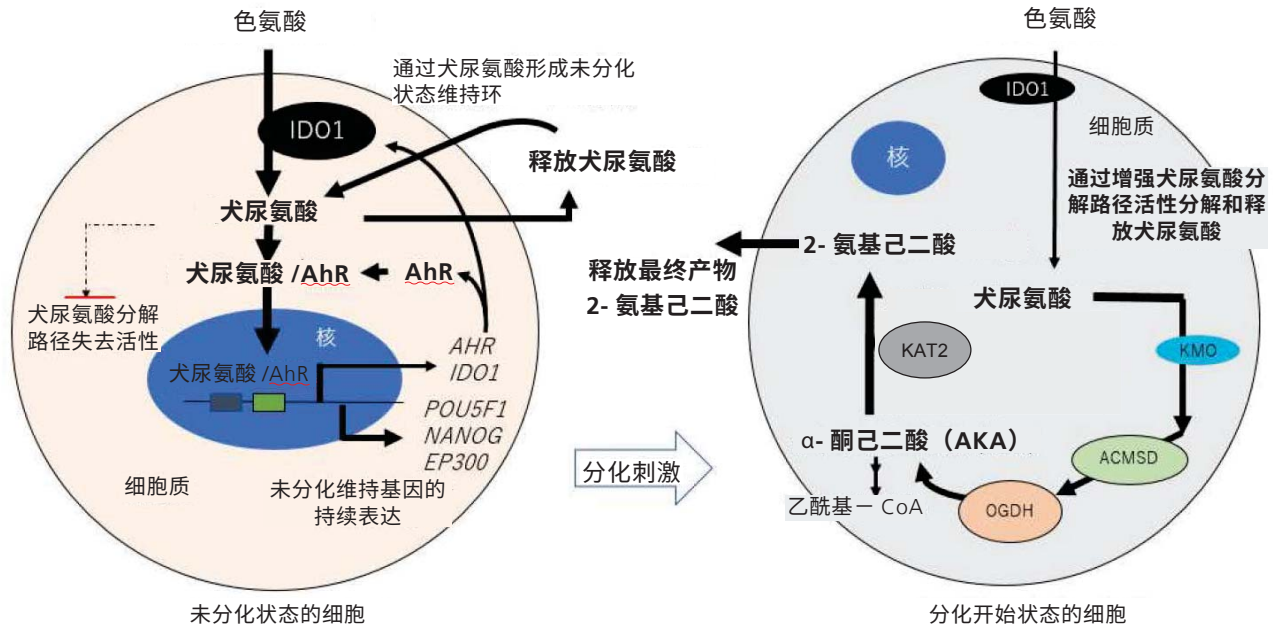


图 9 Kynurenine、2-Aminoadipic acid 的代谢路径与基因表达的相关图

■ 结论

通过使用 C2MAP 对培养上清液的多重成分进行同时分析, 分别鉴定出了 Kynurenine、2-Aminoadipic acid, 作为在未分化 iPS 细胞、外胚层分化细胞中表示特征性波动的标志物成分。结果表明, 所鉴定出的标志物成分是与细胞的未分化 / 外胚层分化状态密切相关的因子。因此, 通过使用本系统, 可以对细胞状态进行非侵袭性的评价。

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).

岛津应用云



依据医药产品医疗器械法, 本文件中所述的产品未获得作为医疗器械的批准。不能用于治疗诊断目的及其手续。



岛津企业管理 (中国) 有限公司
岛津 (香港) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

免责声明:

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;
* 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2020 年 1 月