

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月20日現在

機関番号：13601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06724

研究課題名(和文) ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞の成熟化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte

研究代表者

門田 真 (Kadota, Shin)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：70799064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：多能性幹細胞由来心筋細胞の成熟化因子を検索して、成熟化メカニズムを解明するために、成熟化レポーター遺伝子導入ヒト多能性幹細胞株を作製した。CRISPR/Cas9を用いて、心筋の成熟化マーカー遺伝子下流部位特異的に蛍光タンパク遺伝子配列と薬剤耐性遺伝子を挿入し、成熟心筋のみが赤色蛍光を発生しかつ薬剤耐性となるヒトES細胞株樹立に成功した。心筋分化誘導を行ったが、通常の分化誘導法では成熟マーカーの蛍光タンパクの発現が弱く、引き続き遺伝子改変を行っている。また、ラット心筋梗塞モデルへの移植実験において、長期間培養した心筋細胞の方が、短期間培養した場合よりも移植後の心筋成熟化が進む傾向が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多能性幹細胞(ES/iPS細胞)は、多分化能と無限の増殖能をもった細胞であり、再生医療のみならず、創薬、病態解明のツールとして研究開発が進んでいる。ただし、1つの問題点として、これまで報告された分化心筋細胞は、胎児型心筋と同様に未熟である。様々な方法で成熟化を促進すると報告されているが、ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞で成人型と全く同様に成熟させた報告はこれまでにない。特に、再生医療への応用において、サルなどの大動物へ移植後に一過性の心室性不整脈が出現することが報告され、その原因の一つが移植心筋細胞の未熟性によると考えられるため、心筋成熟化は極めて重要な課題である。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanisms of maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (hPSC-CMs), we established a reporter hPSC line to detect and select matured cardiomyocytes by CRISPR/Cas9 gene-editing. We have succeeded in the establishment of the reporter cell line, however, the fluorescent signal was too weak to detect the matured cardiomyocytes, therefore we need to modify the gene-editing strategy. We did also in vivo transplantation study which compared one-month cultured hPSC-CMs with two-month cultured hPSC-CMs. Although hPSC-CMs matured in a time-dependent manner in vivo, an extended in vitro culture period appeared to enhance maturation of hPSC-CMs after transplantation.

研究分野：循環器内科学

キーワード：成熟心筋 多能性幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) は、多分化能と無限の増殖能をもった細胞であり、再生医療のみならず、創薬、病態解明のツールとして研究開発が進んでいる。眼科・脳神経・糖尿病領域においてすでに多能性幹細胞を用いた臨床試験が世界中で始まり、心筋前駆細胞シートを用いた臨床試験もフランスで開始されている。分化心筋細胞を用いた臨床試験は開始されていないが、サル心筋梗塞モデルにおいて、移植した心筋細胞は長期間生着し、電氣的に結合することで心機能を改善することが、現在所属する研究室などから報告され、今後、心筋細胞が心不全などに対する新たな治療法に利用される可能性が高い。医薬品開発においてもヒト多能性幹細胞由来心筋細胞は、QT 延長など心毒性を図るツールとしてすでに実用化されている。また、病態モデルとしても利用可能であり、研究代表者は大学院生の時に不整脈病態モデルを作製し、臨床で使用されている抗不整脈薬の効果を再現した。

ただし、1つの問題点として、これまで報告された分化心筋細胞は、成体型心筋と異なり未熟である。成体心筋と比較して、細胞が小さく、心筋サルコメア構造やT管、ミトコンドリアの発達が未熟である。また、未熟型心筋の特徴である自己拍動性を保ち、成熟型心筋に必要な静止膜電位を形成するイオンチャネルの発現が少ない。これまでに、長期培養や、電氣的・物理的な刺激、薬剤投与、培養条件の変更などが成熟化を促進すると報告されているが、ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞を成人型と全く同様に成熟させた報告はこれまでにない。特に、再生医療への応用において、サルなどの大動物へ移植後に一過性の心室性不整脈が出現し、その原因の一つが移植心筋細胞の未熟性によると考えられるため、心筋成熟化は極めて重要な課題である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、**多能性幹細胞由来心筋細胞の成熟化因子をレポーター遺伝子導入細胞株と移植後心筋を使って検索し、心筋成熟化のメカニズムを解明すること**である。

具体的な研究計画として、

成熟化レポーター遺伝子導入細胞株を作製する。

心筋梗塞後ラット心臓に心筋細胞を移植し、組織学的解析により成熟化メカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

成熟化レポーター遺伝子導入細胞株の作製

心筋細胞のマーカーが発現すると GFP 蛍光が発色して緑色になるヒト ES 細胞株に、成熟心筋マーカーの下流に CRISPR/Cas9 を用いて DsRed 遺伝子をノックインし、成熟した心筋細胞のみが赤色の蛍光タンパクを発色し、イメージングで容易に検出できるようになる。

ラット心臓への心筋細胞移植

蛍光カルシウムセンサーである GCaMP3 を遺伝子導入したヒト iPS 細胞から心筋細胞を分化誘導し、ラット心筋梗塞モデルに  $2 \times 10^7$  個のヒト由来心筋細胞を移植する。その際、移植心筋細胞の分化誘導開始後の週齢を 4 週と 8 週の 2 種類を用意し、長期培養したものの移植後の成熟化促進の有無などを検討する。移植 1-3 ヶ月後に心臓を取り出し、GFP をマーカーとして、生着グラフト心筋を同定し、組織学的解析を行う。

## 4. 研究成果

成熟化レポーター遺伝子導入細胞株の作製

ヒト ES 細胞株 H9 の成熟心筋マーカーの下流に蛍光タンパク遺伝子と薬剤耐性遺伝子を CRISPR/Cas9 を用いて遺伝子導入し、レポーター遺伝子導入細胞株の作製に成功した。心筋分化誘導を行ったが、DsRed の蛍光発現が弱く、成熟心筋細胞への誘導効率が低いと判断され、遺伝子改変の方法に問題があると考えられた。現在別の蛍光タンパク遺伝子を用いた遺伝子改変を行っている。

ラット心臓への心筋細胞移植

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を 4 週後と 8 週後に回収

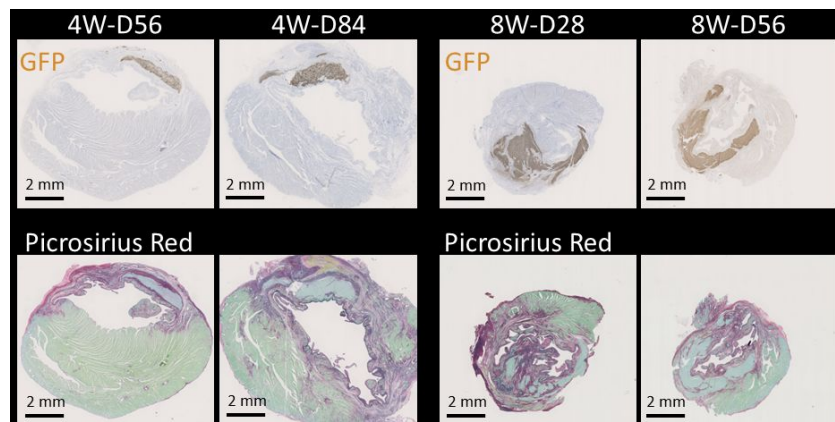


図 1. ラット心臓内に生着したヒト iPS 細胞由来心筋細胞 .4 週培養心筋移植 56 日後(4W-D56)、84 日後(4W-84)、8 週培養心筋移植 28 日後(8W-28)、56 日後(8W-56)全ての群において、生着心筋が見られた。

し、ラット心筋梗塞 7 日後の心臓に直接注入して移植した。分化誘導後の細胞日齢をそろえるために、4 週培養心筋では 56 日 (4W-D56 群) と 84 日 (4W-D84 群)、8 週培養心筋では 28 日 (8W-D28 群) と 56 日 (8W-D56 群) に心臓組織を取り出し、移植後の組織学的解析を行い、GFP による生着グラフト心筋の確認と Picrosirius Red 染色による梗塞領域の同定を行った (図 1)。

それぞれの群における生着心筋グラフトサイズを比較したところ、8 週間長期培養した心筋細胞を移植した時の方が、4 週間培養した心筋細胞を移植した群と比較してグラフトサイズが大きくなる傾向があった (図 2)。

さらに免疫組織化学染色により、移植心筋の成熟度を評価するために、心筋サルコメア構造の Z 帯を標識する  $\alpha$ -Actinin の発現を比較したところ、移植後の期間が長くなるほど、心筋細胞がより整列して、配向性を持つことが分かった。また、分化誘導後の細胞日齢を 84 日にそろえた比較では、長期培養した 8 週心筋を移植した群において、より成熟化が進むことが分かり、移植前の培養日数が移植後の心筋成熟化に影響することを示した (図 3)。

これまで報告のある研究におけるヒト多能性幹細胞由来心筋細胞の移植時の日齢は 20 日前後のものが多く、我々の知る限り 2 か月近く長期培養して移植した報告はほとんどない。実際に、長期培養した心筋細胞を移植した時に、短期培養した群と比較して、生着心筋グラフトサイズが大きくなり、かつ成熟化が進む傾向を示したことは本研究で得られた新たな知見である。現在、そのメカニズムを解明するために、種々の免疫組織化学染色などを行っており、近日中に論文投稿を予定している。

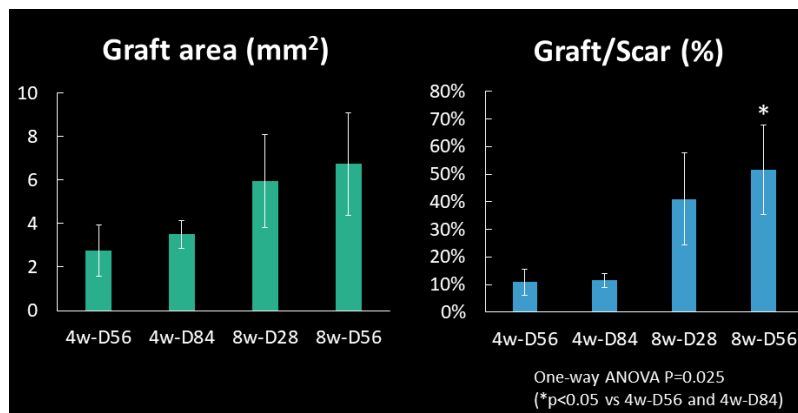


図 2. ヒト由来心筋グラフトサイズの比較 .4 週培養心筋移植に比較して 8 週培養心筋移植の群において、生着心筋グラフトサイズが大きい傾向が見られた。

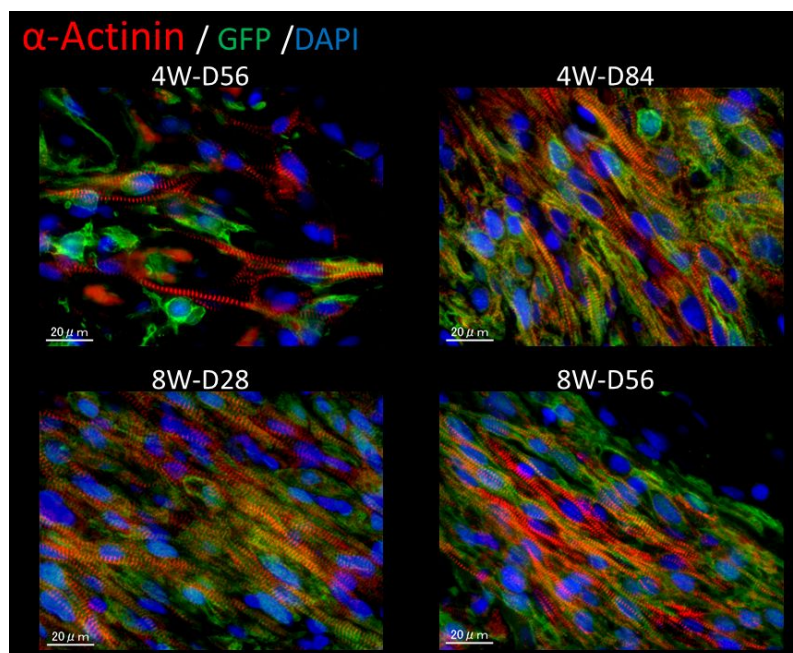


図 3. ヒト由来心筋細胞の移植後の成熟化 .培養 4 週心筋移植に比較して培養 8 週心筋移植の群において、生着心筋細胞内の Actinin 陽性サルコメア構造がより整列する傾向が見られた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Shin Kadota, Yuji Shiba, Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocyte Transplantation for Heart Disease Treatment, 査読無、Current Cardiology Reports, 2019 in press、<https://link.springer.com/journal/11886>

Shin Kadota, Naoko Shiba, Yuji Shiba, Cardiac Sodium Channel Disease Modeling Using Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells, 査読無、Circulation Journal, 2017; 81, 1764-1765, 10.1253/circj.CJ-17-1134

〔学会発表〕(計 2 件)

1) 門田真、Extended in vitro culture enhanced maturation and engraftment of human iPSC-derived cardiomyocytes、第2回日本循環器学会基礎研究フォーラム、2018年

2) 門田真、Long-term culture in vitro enhanced maturation and engraftment of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in vivo、American Heart Association Scientific Sessions 2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。