

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07335

研究課題名（和文）心筋細胞の発生学的成熟化スイッチの解明と、ヒトiPS細胞由来心筋細胞への応用

研究課題名（英文）Elucidation of embryological maturation switch of cardiomyocytes and application to human iPS cell-derived cardiomyocytes

研究代表者

服部 文幸（HATTORI, Fumiyuki）

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：50398624

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトiPS細胞由来心筋細胞の低い成熟性は実用の障害である。報告者は、心臓再生医療を開発する中で、特定の発生段階において心筋細胞の成熟スイッチがオンになる新知見を得た。本研究では、心筋細胞成熟スイッチの構成要素を明らかにしようと試みた。独自開発した方法を用い、成熟スイッチの一つが存在する発生時期の前後で心筋細胞、非心筋細胞を分取・精製し、これらの網羅的遺伝子発現比較解析を実施し、オリジナルの未熟マーカー、成熟マーカー遺伝子群を選定した。さらに、今回新規に見出した心筋成熟スイッチ候補因子群の単独添加した心筋細胞において遺伝子発現の変化を測定したところ、幾つかで成熟性を上昇させる効果が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトiPS細胞から分化誘導した心筋細胞の成熟性が低いという事実は、これらを医療や創薬に応用するための大きな障害である。そのため、これを改善することは、医療の向上や創薬の効率化に繋がる。また、ヒトの発生において心筋細胞が分化し、その後成熟して行く過程に、どのような刺激や環境が重要であるのかを明らかにすることは、発生学的な意義がある。従来知識では、継続的に心筋細胞をトレーニングするような刺激が重要とされてきたが、報告者は、発生期における一過性の刺激が成熟化スイッチのような役割を担っていることを示唆し、この一端を解明した。

研究成果の概要（英文）：The low maturity of human iPS cell-derived cardiomyocytes is a practical obstacle. The representatives gained new insights that switch on cardiomyocyte maturation at specific stages of development. In this study, we attempted to clarify the components of the cardiomyocyte maturation switch. The cardiomyocytes and the non-cardiomyocytes were sorted and purified from each heart before and after the developmental switch-period, and comprehensive gene expression analyses were performed. We obtained the original immature and maturation markers. Furthermore, when the changes in gene expression were measured in cardiomyocytes to which the newly discovered myocardial maturation switch candidate factor group was added alone, some of them suggested the effect of increasing maturity.

研究分野：創薬、再生医療

キーワード：ヒトiPS細胞 心筋 成熟

1. 研究開始当初の背景

ヒトiPS細胞から分化させた様々な細胞種を創薬応用するにあたって、共通する最大の問題点の一つは、これらが体細胞としての成熟性が低いために、薬剤候補物質の安全および有効性の推定に限界が生じることである。心筋細胞についても同様であり、成熟心室筋では持たない自動能を有し、拡張期電位が浅く、活動電位も低い、さらには活動電位持続期間中の活動電位の維持が不十分であり、不応期の完全性が低い。また一部の収縮蛋白質は、成熟に伴ってサブタイプ変換を起こすが、トロポニンや、ミオシン重鎖が胎児型を示す。形態においても心筋細胞特有のロッド状の形態を示さず、心筋細胞と心筋細胞の結合面に介在板が形成されていない。成熟型ギャップジャンクション構成蛋白質であるConnexin-43の発現量も低い。これらの未熟性をin vitroで成熟化させることが出来れば、大変有用である。これらの幼弱性について、各々について改善を認める報告は散見されるが、心筋細胞としての成熟を成したとは考えにくい。報告者は、総体として心筋細胞を成熟に導くには、発生時の環境において成熟化を指令する環境(成熟化スイッチ)を再現することが重要であり、このスイッチなくしては、様々な運動や電気、増殖刺激を与えることでみられる成熟化は、刺激に依存した一面的で一時的な適応であろうと考えた。

2. 研究の目的

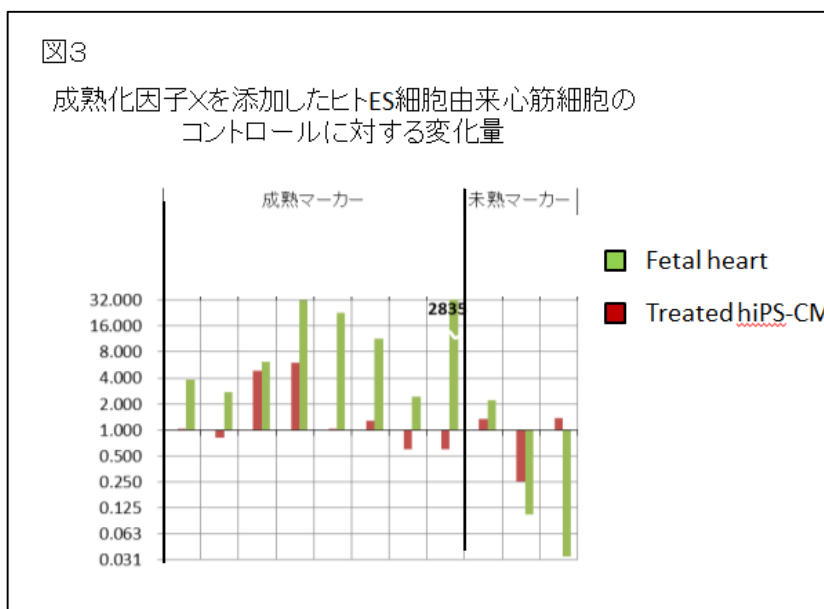
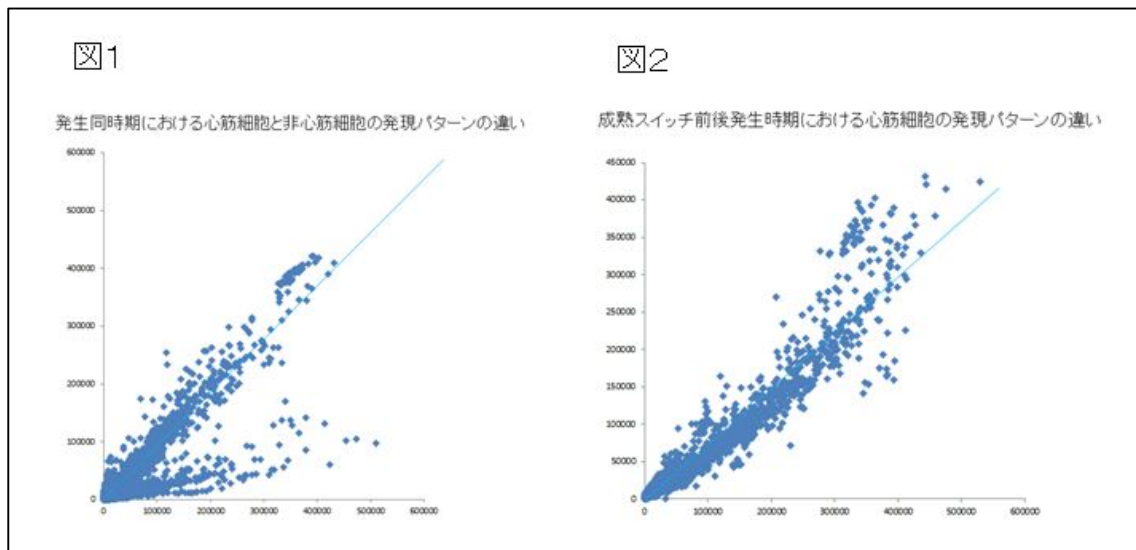
報告者は、ヒトiPS細胞由来心筋細胞の移植による心臓再生医療を開発する中で、これらの未熟性を改善する方法を探索した。この結果、特定の発生段階において心筋細胞の成熟におけるスイッチがオンになるという新しい知見を得た。本研究では、心筋細胞成熟化に必須なスイッチの構成要素を明らかにしようと試みた。

3. 研究の方法

心臓は、心筋細胞とこれよりも数の多い非心筋細胞によって構成されている。これゆえ、心臓全体を用いた遺伝子発現の比較解析では、心筋細胞の遺伝子変化が見落とされ、非心筋細胞における変化を心筋における遺伝子発現変化と混同する可能性がある。報告者が開発したミトコンドリア含有量を指標としセルソーターにより心臓から心筋細胞と非心筋細胞を分取精製する方法を用い、成熟スイッチの一つが存在する発生時期の前後で心筋細胞を精製した。これらの網羅的遺伝子発現の比較解析を実施した。

4. 研究成果

成熟スイッチの一つが存在する発生時期の前後で心筋細胞および非心筋細胞を精製した。これらの網羅的遺伝子発現の比較解析を実施した。心筋細胞と非心筋細胞では、非常に大きな発現変化を示す遺伝子群が存在したことから、精製による心筋細胞と非心筋細胞の分離の意義が確認された（図1、2）続いて成熟化スイッチの前後で心筋細胞の遺伝子発現を比較した。倍以上の差異を示す874遺伝子を見出した。続いてこれらの遺伝子調節における上流解析を実施した結果、18の外部刺激因子が予測された。これらの因子単独で精製したヒトiPS細胞由来心筋細胞に添加したところ、様々な形態的变化を見出した。さらに上記ラット心筋における遺伝子比較アレイで10倍以上変化した185遺伝子に関して、ヒトiPS細胞由来精製心筋細胞



由来 mRNA、ヒト発生前期胎児心臓由来 mRNA、ヒト発生後期胎児心臓由来 mRNA、成人ヒト心臓由来 mRNA を入手し、ヒトにおける遺伝子発現変化を確認し、オリジナルの未熟マーカー13種、成熟マーカー16種を選定した。心筋成熟スイッチ候補因子群の単独添加した心筋細胞

において遺伝子発現の変化を測定したところ、幾つかで成熟性を上昇させる効果が示唆された（図3）。今後最も成熟マーカーを増強させ、未熟マーカーを減少させた因子を混合処理したヒトiPS細胞由来心筋細胞を、親生子マウス心臓や成体マウス心臓へ移植し、移植後の変化を観察することで、成熟スイッチの効果を検証する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------