

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17554

研究課題名(和文) 多能性幹細胞由来心筋細胞による傷害心筋修復機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the cardiac repair-mechanism by pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトES細胞由来心筋細胞をラット心臓へ移植し、細胞特性の時系列変化を組織学的および分子生物学的に解析した。生着した心筋細胞からLaser microdissectionを用いて微量RNAを抽出し、*in vitro*での長期培養心筋と比較したRNAシーケンス解析を行い、*in vivo*における生着心筋の網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、生着した移植心筋グラフトにおいて、培養環境と比較して自動能を持ったペースメーカー細胞の割合および自動能に関わる遺伝子の発現が低下し、相対的に成熟した心室筋の割合が増加することを報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多能性幹細胞由来心筋細胞を用いた心筋再生療法は臨床試験が開始されたが、移植後の心室性不整脈出現が解決すべき課題として残されている。本研究で明らかになった生着心筋細胞の特性変化は、不整脈が移植1ヵ月後をピークとして徐々に減少するメカニズムの1つであると考えられた。今後、ペースメーカー細胞の割合を減らした場合や、成熟させた心筋を移植した場合に、不整脈の出現が減少するかを大動物を用いた実験で検証する必要がある。

研究成果の概要(英文)：When human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes (hESC-CMs) were transplanted into athymic rat hearts, proliferative capacity was lower for nodal-like than working-type cardiomyocytes with grafted cardiomyocytes eventually comprising only relatively mature ventricular cardiomyocytes. RNA-sequencing of engrafted hESC-CMs confirmed the increased expression of mature ventricular cardiomyocyte-related genes, and simultaneous decreased expression of nodal cardiomyocyte-related genes. Temporal engraftment of electrical excitable nodal-like cardiomyocytes may thus explain the transient incidence of post-transplant ventricular tachycardia, although further large animal model studies will be required to control post-transplant arrhythmia.

研究分野：循環器内科学

キーワード：多能性幹細胞 特性変化 心筋成熟化

1. 研究開始当初の背景

多能性幹細胞由来心筋細胞移植による傷害心臓の機能回復が報告されているが、幹細胞由来心筋細胞は未熟性・多様性を示し、不十分な治療効果や心室性不整脈の発症といった課題が残されている。一般的な培養条件で分化誘導された多能性幹細胞由来心筋細胞は、胎児型の未熟な性質を持つことが知られ、研究代表者らの前研究 (Kadota et al, *Stem Cell Reports* 8: 278-289, 2017) などにおいて、移植して生着した心筋細胞の組織学的解析により、移植後の期間に依存して徐々に成熟することが報告されている。特に、心筋トロポニン I などのサルコメア構造蛋白や、コネキシン 43 などのギャップ結合蛋白などの成熟が見られたが、培養条件 (*in vitro*) と生体内条件 (*in vivo*) における心筋細胞の成熟度を詳細に比較した報告は少ない。また、移植後の心室性不整脈は、心拍数の少ない大動物において出現を認めるが、多くの場合は移植 1 ヶ月後をピークとして徐々に発症頻度が減少することが知られている。その出現メカニズムとして、移植心筋からの自動能に伴う異所性ペーシングによることが最近報告されており (*Nat Biotechnol* 36:597-605, 2018, *Stem Cell Reports* 12:967-981, 2019)、*in vivo* における生着した心筋細胞の詳細な成熟度や特性の評価は、移植後不整脈の出現を抑制した安全な心筋再生療法の開発に応用できる可能性がある。

2. 研究の目的

移植後の多能性幹細胞由来心筋細胞の時空間的特性変化を組織学的、分子生物学的手法を用いて解析することによる傷害心筋修復機構の解明を目的とする。最適化された移植細胞の組成・特性を解明し、効果的で安全な心筋再生医療の実現を可能にする。

3. 研究の方法

ヒト ES 細胞由来心筋細胞を単層培養法により分化誘導した心筋細胞を 20 日後に回収して冷凍保存したのち、 2×10^7 個を無胸腺ラット心臓に移植した。移植 2 - 12 週間後にパラフィン切片を作製し、組織学的解析を行った。同時に凍結切片を作製し、生着グラフト心筋を Laser Microdissection (Leica) を用いて切り出し、Arcturus PicoPure RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて微量 RNA を抽出した。微量 RNA から SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing (TaKaRa Bio) を用いて cDNA ライブラリーを作成し、NovaSeq 6000 platform (Illumina) を用いた RNA シークエンス解析により、グラフト内生着心筋細胞における遺伝子発現を、*in vitro* で同期培養した心筋と比較して解析した。なお、生体内サンプルにはヒトとラット由来リードが混在しているため、Xenome software (*Bioinformatics* 28: i172-178, 2012) を用いて全サンプルにおいて、ヒト由来リードのみを選別して解析した。

4. 研究成果

ヒト ES 細胞由来心筋細胞をラットに移植後、生着した心筋細胞の特性を免疫組織染色により解析した。特に、自動能を持ったペースメーカー細胞で強く発現する、SHOX2, HCN4 (図 1), TBX3 の生体内期間に依存した発現低下を認めた。そのメカニズムとしては、増殖マーカー Ki67 との共染色により、ペースメーカー細胞が非ペースメーカー細胞と比較して、増殖率より低いことにより、割合が低下していることを見出した。

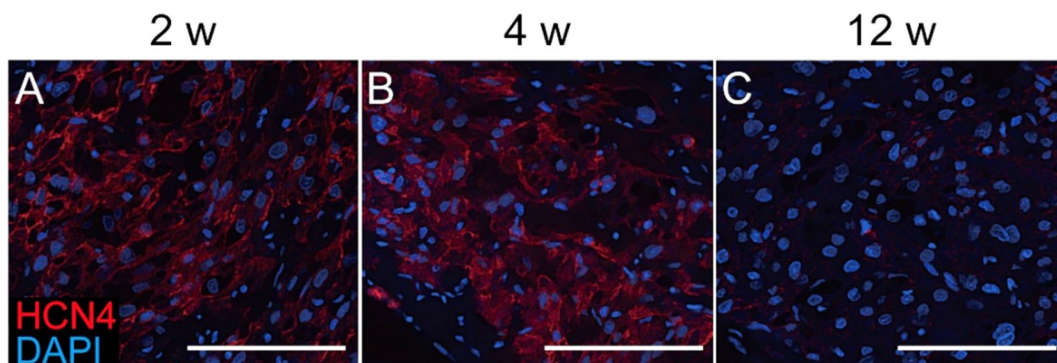


図1 ラット心室内でのヒト ES 細胞由来グラフト心筋細胞の HCN4 発現の時系列変化
免疫染色により自動能に関わる HCN4 の発現が減少していることを確認した (A: 2 週、
B: 4 週、C: 12 週後、スケールバー=100 μ m)。(Ichimura H, Kadota S* et al, *Scientific Reports* 2020)

また、*in vitro* と *in vivo* のサンプルから RNA を抽出し、RNA シークエンス解析を行ったところ、いずれのサンプルも主成分分析において胎児型に近い特徴を持っていたが、時系列に成体型

に近づくことが分かった (図 2)。移植前のサンプル (Day20 CM) と比較して *in vivo* サンプルと *in vitro* サンプルの違いを解析したところ、*in vivo* サンプルでより成熟したサルコメア構造や細胞間接着に関わる遺伝子の発現の上昇を認め、特にペースメーカー細胞に発現する遺伝子のうち ISL1 や SHOX2 の発現が消失した。免疫染色と RNA シークエンス解析において、いずれも自動能に関わる遺伝子の発現が低下し、成熟した心室筋の割合が相対的に上昇した。

以上のことから、移植後生着した心筋細胞の特性は時系列に心室筋の割合が増加して、ペースメーカー細胞の割合が低下することが分かった。移植後に出現する心室性不整脈が自動能を持った未

熟心筋からの異所性興奮によるものであるため、今回の時系列の特性変化は、移植後不整脈が一過性に出現し消失するメカニズムの一つと考えられた。そのため、より安全で有効な心筋再生医療の確立のためには、成熟心筋を移植するもしくは、自動能を持たないように加工した細胞を移植することが、解決策となる可能性が示された。今後、大動物を用いた実験により今回示された解決策により移植後不整脈が減少するかを検証する必要がある。

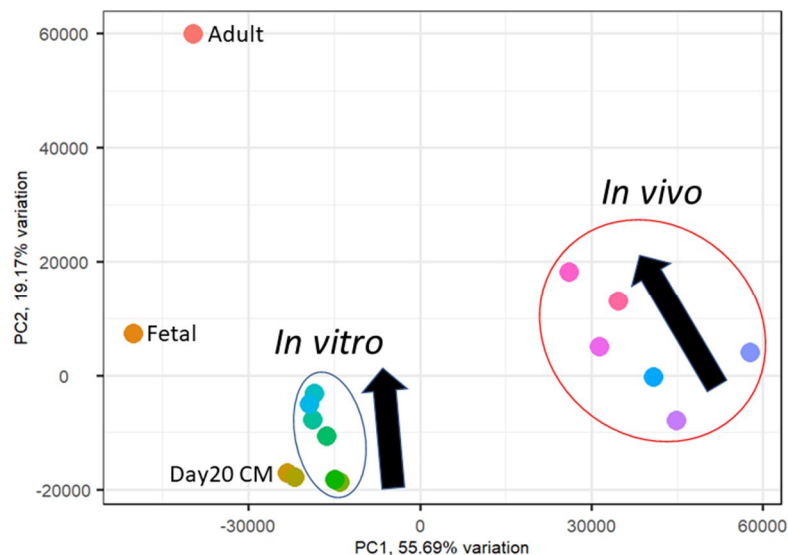


図2. ラット心臓内に生着したヒト ES 細胞由来心筋細胞から得られた微量 RNA を用いた RNA-seq 解析。主成分分析において移植後生着した心筋 (*in vivo*) は、同期間培養したサンプル (*in vitro*) とは大きく特性が異なり、矢印の方向へ時系列に成熟することが分かる。(Ichimura H, Kadota S* et al, *Scientific Reports* 2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ichimura Hajime, Kadota Shin, Kashihara Toshihide, Yamada Mitsuhiko, Ito Kuniaki, Kobayashi Hideki, Tanaka Yuki, Shiba Naoko, Chuma Shinichiro, Tohyama Shugo, Seto Tatsuichiro, Okada Kenji, Kuwahara Koichiro, Shiba Yuji	4. 巻 10
2. 論文標題 Increased predominance of the matured ventricular subtype in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11883
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-68373-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kadota Shin, Tanaka Yuki, Shiba Yuji	4. 巻 76
2. 論文標題 Heart regeneration using pluripotent stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 459 ~ 463
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jjcc.2020.03.013	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 門田 真、柴 祐司	4. 巻 68
2. 論文標題 特集 不整脈治療の最新デバイステクノロジーとリードマネジメント .ペースメーカ バイオペースメーカ	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 循環器ジャーナル	6. 最初と最後の頁 422 ~ 427
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11477/mf.1438200387	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kadota Shin, Shiba Yuji	4. 巻 21
2. 論文標題 Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Transplantation for Heart Disease Treatment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Cardiology Reports	6. 最初と最後の頁 73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11886-019-1171-3	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 市村 創、門田 真、柴 直子、和田 有子、瀬戸 達一郎、柴 祐司
2. 発表標題 ラット心筋内におけるヒトES細胞由来心筋細胞の経時的変化
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 夕祈、門田 真、和田 有子、瀬戸 達一郎、桑原 宏一郎、柴 祐司
2. 発表標題 iPS細胞由来心筋細胞の培養期間延長による移植後細胞生着および成熟化促進について
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 門田 真
2. 発表標題 多能性幹細胞由来心筋細胞を用いた心筋再生医療
3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------