

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08100

研究課題名（和文）ペースメーカー細胞を用いた自動能維持機構の解明と治療法開発

研究課題名（英文）Elucidation of mechanisms for maintaining automaticity by pacemaker cells

研究代表者

門田 真（Kadota, Shin）

信州大学・学術研究院医学系・講師

研究者番号：70799064

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：HCN4発現レポーター遺伝子を導入したヒトiPS細胞から心筋細胞を分化誘導して、長期培養または成熟促進因子を用いて成熟心筋細胞を作製した。心筋細胞を40日間培養したものと比較すると、長期培養や成熟促進因子の添加により、HCN4の発現が減少した。成熟促進因子を添加し長期培養した細胞が最も成熟したが、それぞれ単独と比較してHCN4の発現は低下せず、成熟促進因子と長期培養の相乗効果は見られなかった。一方で、長期間培養した心筋細胞は、移植後の生着能、成熟、血管新生が向上し、CRYAB遺伝子の発現がこれに寄与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多能性幹細胞由来の心筋細胞の成熟過程においてHCN4発現の低下が認められたが、HCN4発現メカニズムの解明には更なる研究が必要である。一方で、成熟心筋細胞を移植した後に生着機能および血管新生能が増進することが示され、多能性幹細胞由来心筋細胞の再生医療応用における重要な進展となると考える。

研究成果の概要（英文）：We differentiated cardiomyocytes from human induced pluripotent stem cells labeled with the HCN4 gene expression and produced mature cardiomyocytes using prolonged culture and maturation-promoting factors. When compared to cardiomyocytes cultured for 40 days, the expression of HCN4 decreased with the addition of prolonged culture or maturation-promoting factors. While cells cultured long-term with the addition of maturation-promoting factors exhibited the highest level of maturity, the expression of HCN4 did not decrease compared to each factor alone, indicating no synergistic effect between maturation-promoting factors and prolonged culture. In another experiment, cardiomyocytes cultured for an extended period showed improved engraftment, maturation, and angiogenesis post-transplantation, suggesting a contribution of CRYAB gene expression to these improvements.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：HCN4 自動能 心筋細胞 成熟化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでの虚血性心疾患モデルでの多能性幹細胞由来心筋細胞を直接注入して行った移植実験において、ラットやモルモットといった小動物では、移植後に不整脈を認めなかったが、サル心筋梗塞モデルでは、移植後1カ月をピークとして心室頻拍などの心室性不整脈が認められた。電気生理学的検査、電気解剖学的マッピングにより、ヒト細胞のサルへ移植後の心室性不整脈の原因は、リエントリー性不整脈ではなく、グラフト細胞の自動能によることが示された(Nat Biotechnol 36:597-605, 2018)。また、ヒト由来心筋細胞のブタ心臓への移植後にも同様の心室性不整脈が出現し、電気生理学的検査により自動能による不整脈であることが示された(Stem Cell Reports 12:967-981, 2019)。

以上の研究から、移植細胞が生着してホストの細胞と電氣的に結合することが分かり、分化心筋細胞のうちペースメーカー細胞を純化することにより生物学的ペースメーカーの開発に応用できる可能性が示された。一方で、移植する心筋細胞は主に、分化誘導1カ月以内の未熟心筋で自動能を保つため、移植前に成熟させることが、移植後の不整脈を減らす可能性がある。これまでに、長期培養や電氣的・機械的刺激、薬物の添加や培養環境の変更などにより、*in vitro*で成熟することが報告されているが、成熟させた心筋細胞は分裂能を失うことから、移植後の生着効率が低下する恐れがある。また、成熟に伴い自動能に関わるイオンチャネルの1つであるHCN4の発現がどの程度低下するのかは明らかでない。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞に含まれるペースメーカー細胞を標識し、ペースメーカー細胞の自動能維持機構を解明するために心筋成熟との関連を解析した。また、成熟させた心筋細胞の移植後生着効率や、成熟心筋細胞におけるHCN4発現を検証した。

3. 研究の方法

HCN4 遺伝子下流に CRISPR/Cas9 を用いて、tdTomato 遺伝子を挿入した HCN4 発現レポーター遺伝子導入ヒト iPS 細胞株を作製し、心筋細胞を分化誘導し、成熟を促す薬剤(甲状腺ホルモン、ステロイドホルモン、PPAR α 作動薬)を投与して HCN4 発現が低下するかを検討した。また、培養期間を延長した成熟心筋細胞をラット心筋梗塞モデルに移植して、生着した移植グラフトサイズを組織学的に解析し、グラフトを増大させる因子を検索した。

4. 研究成果

HCN4 レポーター遺伝子導入ヒト iPS 細胞から心筋細胞を分化誘導し、長期培養と成熟促進因子添加を組み合わせる心筋細胞の成熟化を試みた。実験に用いた心筋細胞は、成熟促進因子を加えずに40日と60日間培養した心筋細胞、および成熟促進因子を分化誘導20日から20日間添加して分化誘導40日と60日に回収した心筋細胞である。これら4群に対してHCN4の発現を評価し、心筋細胞の成熟度との相関を比較検討した(図1)。

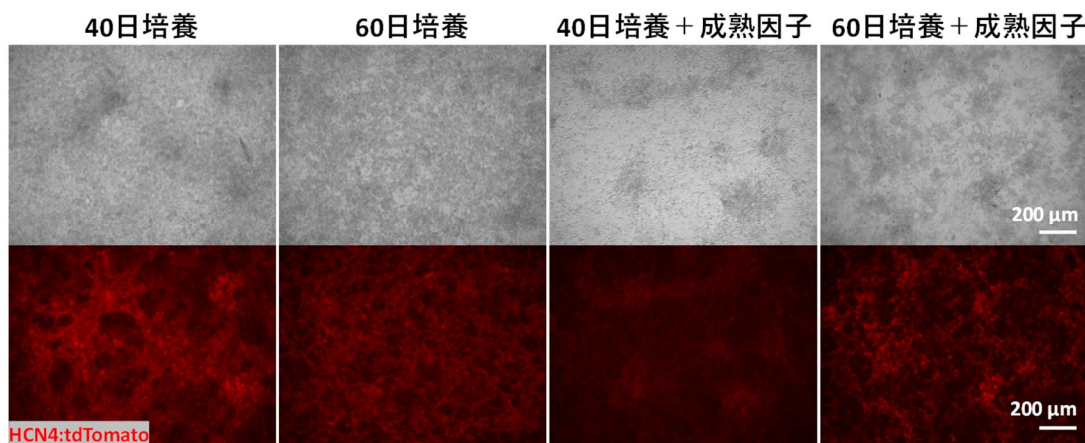


図1. 長期培養および成熟因子添加に伴う心筋細胞における HCN4 発現変化

左端の40日培養と比較して培養延長と成熟化因子添加はそれぞれ HCN4 発現を低下させたが、両方を組み合わせた右端の条件では HCN4 の発現は最も低下しなかった(上段:位相差、下段:蛍光顕微鏡写真)。

フローサイトメトリーや蛍光顕微鏡によるレポーター蛋白の発現解析、RNA 発現解析、および電気生理学的解析の結果、40 日間培養した心筋細胞に対して長期培養や成熟促進因子を添加することで HCN4 の発現が減少し、心筋細胞の成熟度と HCN4 発現は逆相関した。一方、細胞サイズや RNA の成熟マーカーの発現から最も成熟したのは成熟因子を添加したうえで、長期培養した心筋細胞であった。しかし、長期培養と成熟プロトコルそれぞれ単独と比較して、両方を組み合わせても、HCN4 の発現を減少させる相乗効果はなかった。

以上の結果から、多能性幹細胞由来心筋細胞における HCN4 発現低下には、心筋成熟のみならず、心筋成熟以外の因子が関与していることが示唆された。

次に、成熟心筋細胞の生着能を検討する実験において、ヒト iPS 細胞から、培養期間 28 日 (D28-CM) と 56 日 (D56-CM) の心筋細胞を作製した。D56-CM では成熟サルコメア遺伝子の発現が高く、細胞増殖率は D28-CM の方が高かった。無胸腺ラットへの移植実験では、改変型ルシフェラーゼ Akaluc (Science 359: 935–9, 2018) を用いた生物発光イメージングにおいて、D56-CM 移植群が移植後 8-12 週で高い発光強度を示した。組織学的評価では、D56-CM 移植群がグラフト面積や心筋トロポニン I 陽性割合の増加を示し、移植グラフトの成熟が促進された。また、D56-CM 移植群ではアポトーシスが少なく、活性酸素種に対する抵抗性も高かった。さらに、D56-CM 移植群では血管新生が一貫して促進された (図 2)。

RNA シークエンスや qRT-PCR、ウェスタンブロット解析により、成熟心筋細胞に高発現する α B-crystallin (CRYAB) が D56-CM で高発現していることが確認された。CRYAB をノックダウンした D56-CM では血管内皮細胞の遊走やチューブ形成が阻害され、逆に CRYAB を過剰発現させた D28-CM を移植すると血管新生が促進された。

これらの結果から、iPS 細胞由来心筋細胞の培養期間を延長すると、移植グラフト

の生着、成熟、血管新生が促進されることが明らかになった。以上の結果は Stem Cell Research & Therapy 誌に報告した。

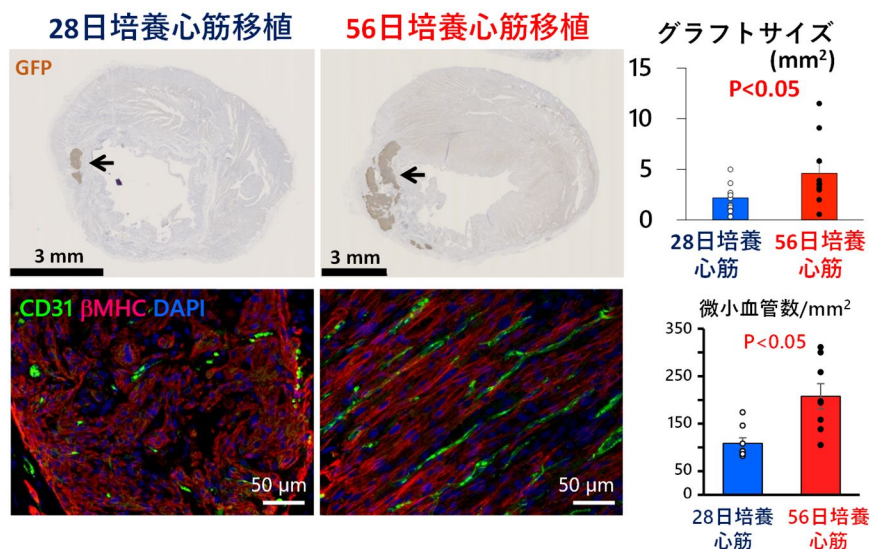


図 2. 長期培養心筋移植後 12 週後のグラフト増大と血管新生

28 日培養心筋と比較して、56 日培養心筋移植後の方が、GFP で標識された生着心筋グラフト (上段矢印) の増大を認めた。グラフト内微小血管数は長期培養心筋移植後の方が増加した (下段)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Tanaka Yuki, Kadota Shin, Zhao Jian, Kobayashi Hideki, Okano Satomi, Izumi Masaki, Honda Yusuke, Ichimura Hajime, Shiba Naoko, Uemura Takeshi, Wada Yuko, Chuma Shinichiro, Nakada Tsutomu, Tohyama Shugo, Fukuda Keiichi, Yamada Mitsuhiro, Seto Tatsuichiro, Kuwahara Koichiro, Shiba Yuji	4. 巻 14
2. 論文標題 Mature human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes promote angiogenesis through alpha-B crystallin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13287-023-03468-4	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 門田 真、柴 祐司
2. 発表標題 多能性幹細胞由来心筋細胞移植の現状と可能性
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 田中夕祈、門田 真、柴 祐司
2. 発表標題 長期培養したヒト人工多能性幹細胞由来心筋細胞はCRYABを介して移植グラフトの血管新生を促進する
3. 学会等名 第31回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 門田 真
2. 発表標題 心筋成熟化の再生医療へのインパクト
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 門田真
2. 発表標題 Cardiac regeneration research using iPS cell-derived cardiomyocytes
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022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の成熟化について
3. 学会等名 第50回日本心脈管作動物質学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞又はその細胞の集団のレシピエントへの移植時期を決定する方法	発明者 柴祐司、門田真	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-104610	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------