

論文内容の要旨

Spatiotemporal imaging documented the maturation of

the cardiomyocytes from human induced pluripotent stem cells

時空間イメージング法によるヒト iPS 細胞から分化した心筋細胞の成熟過程の実証

日本医科大学大学院医学研究科 心臓血管外科学分野

大学院生 青山純也

The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 掲載予定

【背景】

ヒト iPS 細胞から分化した心筋細胞は、循環器再生医療の分野で期待が寄せられている生体素材である。本研究では、同期収縮や規則的な拍動を始める心筋細胞塊の分化段階に関して、免疫組織化学染色（免疫染色）法、生理学的解析方法、遺伝子学的解析方法、時空間イメージング法（時間周波数解析）によりそれらの変化を明らかにし、今後移植可能な生体素材の開発に関わる基礎的な実証研究を行った。

【方法】

本研究では、まずヒト iPS 細胞に遺伝子編集技術（CRISPR/Cas9）を応用して、幼弱心筋細胞に発現する心筋タンパクの一つである α ミオシン重鎖のプロモータ（ α MHCp）と緑色蛍光タンパク遺伝子（eGFP）をヒト iPS 細胞に導入し、心筋細胞（ α MHC）の発現を可視化した細胞ラインと、ペースメーカー細胞の発現に関与する代表的な遺伝子（hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4: *HCN4*）のホモロジーアームの 3' 末端に、黄色蛍光タンパク（YFP）遺伝子を導入して *HCN4* の発現を可視化した細胞ラインを作製。これらの遺伝子導入細胞ラインは、iPS 細胞本来の未分化性を維持している事を確認した。これらの細胞を培養し、三次元培養器で細胞塊（胚葉体）へと形成した。形成された胚葉体を攪拌培養器へ移し、心筋分化用培養液内で骨形成因子 4 や Activin A、線維芽細胞成長因子、IWR-1、Vascular endothelial growth factor などの各種サイトカインを段階的に作用させて効率的に拍動する心筋細胞へと分化させた。分化開始後 15 日目に接着培養へ移し、150 日目まで継続して分化培養を行った。分化開始から 49 日目までを早期分化段階（Early stage）、50 日目から 99 日目までを中期分化段階（Middle stage）、100 日以降を後期分化段階（Late stage）とした、各分化段階における拍動する胚葉体の心筋細胞やペースメーカー細胞、各種イオンチャネルの発現に関連する遺伝子や、細胞間のギャップ結合タンパクを発現する遺伝子を qRT-PCR で解析し、各分化段階での発現レベルの変化を比較した。また免疫染色で各分化段階における各種タンパク発現を確認し、細胞塊内の個々の細胞の拍動パターンを時間周波数解析（諏訪東京理科大学との共同研究）で評価し、拍動する心筋細胞塊の興奮伝播の様子、拍動の同期性をカルシウムイメージング法によって解析し、各分化段階におけるそれらの変化を分析した。

【結果】

分化開始後 30 日未満の早期分化段階では、ヒトの分化段階における未熟心筋の発現に関与する *MYH6*（ α MHC の発現を司る遺伝子）の発現レベルが比較的高く、成人心筋に発現する K^+ チャネルや Ca^{2+} チャネルの発現を司る mRNA の発現レベルは低かった。また

心筋細胞間を電気生理的に結合させるギャップ結合の発現を司る遺伝子 *GJA1* の発現レベルも低く、それに応じてギャップ結合タンパク (Connexin43) の発現が少ない事が免疫染色の結果から認められた。そのため早期分化段階の心筋拍動は同期せず、さらに拍動心筋細胞塊に含まれる拍動の要素には、時間周波数解析から優位な周波数が認められなかった。それらが分化 70 日目以降には *MYH6* の発現は有意に低下し、ギャップ結合に関しては *GJA1* 発現、Connexin43 発現共に有意に増加した。その他、 K^+ チャネルの増加も認められ、時間周波数解析では優位な周波数が認められ拍動の同期性が示唆された。さらにカルシウムイメージング解析により、分化 70 日目以降には細胞内カルシウム濃度の上昇が細胞塊内で一斉に立ち上がり、細胞塊内での拍動が同期している事が明らかとなった。そして後期分化段階では、その拍動の同期性は保たれたまま周波数は小さくなり、拍動回数自体も減少している事が *HCN4* の発現の有意な漸減と共に観察された。

【考察】

本研究では、早期分化段階にある心筋細胞にはペースメーカー細胞の発現を司る遺伝子 *HCN4* が比較的高く発現している事が解明された。しかしながらギャップ結合による細胞間連結が早期分化段階には少ない為、時間周波数解析やカルシウムイメージング法によって、それらの拍動が無秩序で非同期的である事が観察された。分化日数が経過すると共に、未熟心筋マーカー (α MHC) は低下する一方で、ギャップ結合タンパクやイオンチャネルが相対的に増加する事で、細胞個々の拍動が機能的合胞体として一塊の拍動へと同期するように変化した。またペースメーカー機能に関しては、そのタンパク発現を司る *HCN4* の発現が分化日数が経過するにつれて低下する事で、自律拍動が低下した、同期拍動する心筋細胞へと分化したと考えられる。今後のヒト iPS 細胞から分化培養された、心筋細胞移植による再生医療について考察すると、未熟心筋の移植により不整脈発生が危惧される結果であったため、分化日数が 70 日以上経過した、同期拍動する心筋細胞が、移植には適していると考えられた。

【結論】

将来の循環器再生医療において、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の細胞骨格や機能的な同期収縮をする性質の獲得時期を考慮すると、移植可能な生体素材としては分化開始後 70 日以上の日数が必要である事が、本研究から明らかとなった。