

ヒト iPS 細胞由来分化心筋細胞に関する長期培養による成熟化の検討

分担研究者 牧山 武 京都大学大学院医学研究科循環器内科学 助教

研究要旨 ヒト人工多能性幹（induced pluripotent stem: iPS）細胞は、移植治療、疾患の病態解明への有用性が期待され、現在、非常に盛んな研究が行われている。ヒト iPS 細胞由来分化心筋は、成人心筋に比べ未熟であることが研究応用への妨げとなっており、今回、我々は、1年までの長期接着培養における組織学的、遺伝子発現の成熟化を検討した。電子顕微鏡を用いた解析では、経時的にサルコメアの緻密化、A、H、I帯の形成を認めたが、成熟心筋にみられるM帯に関しては、1年にてようやく一部の心筋に認めるのみであった。M帯関連蛋白は、ヒト成人心筋に比べて遺伝子発現が低く、組織学的所見と合致した。本研究では、初めてM帯を形成したiPS細胞由来分化心筋を認めたが、成熟化は緩徐で、不完全であり、より効率的な成熟化法の開発が必要であると考えられた。

A. 研究目的

ヒト人工多能性幹（induced pluripotent stem: iPS）細胞は、移植治療、疾患の病態解明への有用性が期待され、現在、非常に盛んな研究が行われている。心疾患に関する方用に関しては、成人心筋に比べ未熟であることが研究応用への妨げとなっており、今回、我々は、1年までの長期接着培養における組織学的、遺伝子発現の成熟化を検討した。

B. 研究方法

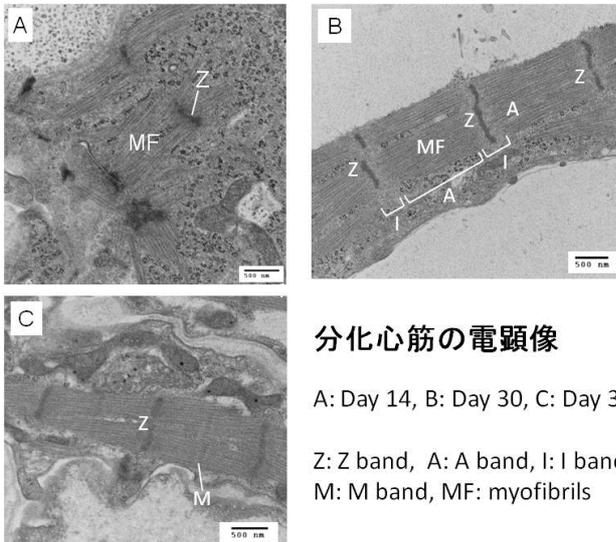
健康人皮膚より樹立した線維芽細胞に、山中4因子（OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC 遺伝子）をレトロウイルスにて導入し作製された iPS 細胞株（201B7）を用いた。胚様体形成法（Yang et al. Nature 2008）を用いて心筋分化し、14、30、60、90、180、360日の分化心筋の解析を行った。（接着培養）電子顕微鏡、免疫染色を用いた組織学的解析、定量的RNA解析を用いた遺伝子発現解析を行った。

C. 研究結果

ヒトiPS細胞は、心筋分化開始後、day 8より自己拍動を開始し、day 360まで胚様体は自己拍動を続

けたが、拍動数の減少を認めた。(day 30, 73.2 ± 34.9 bpm, $n=41$ vs. day 360, 32.2 ± 14.2 bpm, $n=42$, $p < 0.0001$) 酵素処理にてばらした単一心筋細胞の細胞面積は増加していた。(day 30, $3277.4 \pm 1679.5 \mu\text{m}^2$ vs. day 360, $4067.9 \pm 1814.6 \mu\text{m}^2$, $p=0.01$) 自己拍動のある胚様体における心筋細胞の割合を検討するため、microdissection後、酵素処理を行い、免疫染色を行った。心筋トロポニンI陽性の心筋細胞を、day 30, 61% ($n=213$), day 360, 64% ($n=191$) 認め、他に、 β -tubulin陽性の線維芽細胞、 α -SMA陽性の神経細胞を認めた。また、day 360では、MLC2v陽性、MLC2a陰性細胞が36%から60%に増加し、心室筋への成熟化傾向を示した。電子顕微鏡を用いた組織学的解析では、day14では、サルコメアが粗であるが、day30以降密になり、A、I帯の出現を認めた。day 60からday 90にて、H帯が出現し、day 360にてようやく一部の心筋にてM帯を認めた。(図)

遺伝子発現の解析では、M帯関連蛋白(LRRC39, MYOM1, MYOM2)は、成人心筋に比べて低下し、経時的増加も少なく、電子顕微鏡によるサルコメアの成熟化の遅延に合致する結果であった。



分化心筋の電顕像

A: Day 14, B: Day 30, C: Day 360

Z: Z band, A: A band, I: I band, M: M band, MF: myofibrils

D. 考察

本研究は、ヒト iPS 細胞由来分化心筋の長期接着培養における成熟過程を明らかにした。day 30 と day 360 の比較にて、細胞面積の増加や拍動数の低下を認め成熟化の進行と考えられた。遺伝子発現でも、MLC2v 陽性、MLC2a 陰性細胞数が増加し、成熟化傾向を示した。day 360 にてようやく M 帯のある心筋細胞を認めたが、割合は数%と少なく、緩徐な成熟過程であると考えられた。要因としては、ヒト成人心にある液性因子、機械的ストレスなどの欠除が要因と推察された。

本研究の limitation として、micro dissection で胚様体を切りとり RNA 定量を行ったが、胚様体には非心筋細胞も含まれている。心筋トロポニン I 陽性の心筋細胞が、約 60%であった。但し、microdissection 後、3 日間培養後に解析しており、その間に非心筋細胞は増加することを考慮すると実際の割合はそれより高いと考えられた。

E. 結論

幹細胞由来分化心筋の未熟さは以前より指摘されているが、本研究では、長期培養にて初めて M 帯を形成した iPS 細胞由来分化心筋を認めた。但し、成熟化は緩徐で不完全であり、より効率的な成熟化法の開発が必要であると考えられた。

(本研究は Kamakura T, Makiyama T et al. *Circ J* 2013 に発表)

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kamakura T, Makiyama T, Sasaki K, Yoshida Y, Wuriyanghai Y, Chen J, Hattori T, Ohno S, Kita T, Horie M, Yamanaka S, Kimura T. Ultrastructural Maturation of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in a Long-Term Culture.. *Circ J*. 2013 Feb 9.

Villafañe J, Atallah J, Gollob MH, Maury P, Wolpert C, Gebauer R, Watanabe H, Horie M, Anttonen O, Kannankeril P, Faulkner B, Bleiz J, Makiyama T, Shimizu W, Hamilton R, Young ML. Long-Term Follow-Up of a Pediatric Cohort With Short QT Syndrome.. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Jan 25.

Ishikawa T, Takahashi N, Ohno S, Sakurada H, Nakamura K, On YK, Park JE, Makiyama T, Horie M, Arimura T, Makita N, Kimura A. Novel SCN3B Mutation Associated With Brugada Syndrome Affects Intracellular Trafficking and Function of Nav1.5. *Circ J*. 2012 Dec 21.

Hattori T, Makiyama T, Akao M, Ehara E, Ohno S, Iguchi M, Nishio Y, Sasaki K, Itoh H, Yokode M, Kita T, Horie M, Kimura T. A novel gain-of-function KCNJ2 mutation associated with short QT syndrome impairs inward rectification of Kir2.1 currents. *Cardiovasc Res*. 2012 Mar 15;93(4):666-73.

Kimura H, Zhou J, Kawamura M, Itoh H, Mizusawa Y, Ding WG, Wu J, Ohno S, Makiyama T, Miyamoto A, Naiki N, Wang Q, Xie Y, Suzuki T, Tateno S, Nakamura Y, Zang WJ, Ito M, Matsuura H, Horie M. Phenotype variability in patients carrying KCNJ2 mutations. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012 Jun;5(3):344-53.

Watanabe H, Nogami A, Ohkubo K, Kawata H, Hayashi Y, Ishikawa T, Makiyama T, Nagao S, Yagihara N, Takehara N, Kawamura Y, Sato A, Okamura K, Hosaka Y, Sato M, Fukae S,

Chinushi M, Oda H, Okabe M, Kimura A, Maemura K, Watanabe I, Kamakura S, Horie M, Aizawa Y, Shimizu W, Makita N. Clinical characteristics and risk of arrhythmia recurrences in patients with idiopathic ventricular fibrillation associated with early repolarization. *Int J Cardiol.* 2012 Sep 6;159(3):238-40.

in Cardiomyocytes derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells, 第77回日本循環器学会学術集会, 横浜, 3.15-17, 2013.

Yimin Wuriyanghai: Identification of Cardiomyocytes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells using a Cardiac Specific Lentiviral Vector, 第77回日本循環器学会学術集会, 横浜, 3.15-17, 2013.

2. 学会発表

牧山 武: Phenotypic characteristics between SCN5A and LMNA mutation carriers in familial bradyarrhythmic disorders. The 5th Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHRS) Scientific Session, Taipei, Taiwan, 10.3-6, 2012.

牧山武: Disease Modeling in Human Induced Pluripotent Stem Cells -Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia-, 第77回日本循環器学会学術集会, 横浜, 3.15-17, 2013.

鎌倉 令: One-year assessment of the ultrastructural changes of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, European Society of Cardiology (ESC) Congress, Munich, Germany, 8.25-29, 2012.

鎌倉 令: Genetic Backgrounds in Patients with Early-Onset and Familial Atrial Fibrillation, The 5th Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHRS) Scientific Session, Taipei, Taiwan, 10.3-6, 2012.

佐々木 健一: One Year Assessment of Ion Channel Gene Expression in Cardiomyocytes derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells, The 5th Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHRS) Scientific Session, Taipei, Taiwan, 10.3-6, 2012.

佐々木 健一: O Ca²⁺ Imaging of Cardiomyocytes Differentiated from Human Induced Pluripotent Stem Cells in Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia, 第77回日本循環器学会学術集会, 横浜, 3.15-17, 2013.

佐々木 健一: One Year Assessment of Ion Channel Gene Expression

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他