

京都大学	博士 ( 医科学 学)	氏 名	福 島 弘 之
論文題目	Specific induction and long-term maintenance of high purity ventricular cardiomyocytes from human induced pluripotent stem cells (ヒト iPS 細胞からの長期維持可能な高純度心室筋細胞の特異的誘導方法の開発)		
(論文内容の要旨)			
<p>【背景・目的】ヒト iPS 細胞からの心筋細胞は、心臓毒性スクリーニング、創薬、疾患モデリングなど、さまざまな分野への応用が期待されており、高純度のヒト iPS 細胞由来心筋細胞の安定した作製は、ますます需要が高まっている。しかしながら、現在のヒト iPS 細胞からの心筋細胞の分化誘導方法では、心筋細胞と非心筋細胞が混在しながら作製されるため、作製の最終段階に非心筋細胞を除く精製過程が必要となっている。また一旦精製しても次第に純度が低下する。作製された心筋細胞においては、生体の心室筋細胞様、心房筋細胞様、ペースメーカー細胞様など、様々な性質を有する細胞が混ざり合っ構成されている。</p> <p>本研究では、従来の心筋分化誘導方法を手掛かりに、非心筋細胞を除く精製過程なしに高純度の心室筋細胞を作製する方法を開発することを試みた。</p> <p>【方法・結果】まず、これまでの心血管系の分化誘導方法の知見をもとに、ヒト iPS 細胞を無血清二次元培養下において、成長因子である Activin A, BMP4, bFGF を用いて、心筋細胞への分化能を有する中胚葉細胞集団 (血小板由来成長因子受容体-<math>\alpha</math> (PDGFR<math>\alpha</math>) 陽性細胞) を誘導および収集した。収集した PDGFR<math>\alpha</math> 陽性細胞は、2 種類の Wnt シグナル阻害剤 (XAV 及び IWP4) を用いて強力に心筋細胞へ誘導することにより、約 95% の細胞が心筋細胞特異的のマーカである Cardiac troponin T 陽性の細胞に分化した (無処理: <math>7.1 \pm 3.1\%</math>, XAV 単独: <math>74.5 \pm 6.5\%</math>, IWP4 単独: <math>72.2 \pm 6.8\%</math>, XAV+IWP4 併用: <math>94.1 \pm 2.0\%</math>)。この心筋分化能を有する前駆段階の細胞の収集と強力な心筋への分化誘導刺激によって、非心筋細胞を除去する過程なしに高純度の心筋細胞が安定して得られた。さらに 200 日を超える長期間においても高純度を維持し培養し続けることが可能であった。</p> <p>さらに、作製した心筋細胞の性質を詳細に解析した。得られた心筋細胞は、ほぼ全ての細胞において、心室筋の特異的のマーカであるミオシン軽鎖 2v を発現し、長期間の培養によって、その発現はより顕著になることを認めた。また、長期培養した心筋細胞は、横紋 (サルコメア) 構造の成熟化 (Z 帯、M 帯などの形成、サルコメア長の延長(培養初期: <math>1.37 \pm 0.10 \mu\text{m}</math>, 200 日以上培養: <math>1.91 \pm 0.15 \mu\text{m}</math>))、ミトコンドリアの増加・成熟化、さらには成体の成熟化した心筋細胞の構造である T 管様構造を認めた。</p> <p>電気生理学的解析においても、得られた心筋細胞の 90% 以上は、心室筋様の活動電位(AP) 波形を示した。また長期間の培養によって、心室筋細胞の成熟の特徴である最大拡張期電位の低下、電位ピーク値、AP 増幅量、及び AP 上昇の最高速度 (dV/dtmax) の増加を示した。さらに成熟した心室筋細胞が有する IKs 電流を阻害し QT 延長を示すクロマノールに対しても、生体の心室筋と同様の反応を示した。</p> <p>【結語】ヒト iPS 細胞から非心筋細胞の除去過程なしに高純度の心室筋細胞を安定して作製する方法を開発した。本方法では、高純度状態で 200 日以上長期間維持培養が可能であり、長期間の培養により形態学および電気生理学的成熟が確認できた。この作製技術は、心臓毒性試験、疾患モデリングなどの新たな研究用ツールとしての応用が期待される。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞は、再生医療・創薬研究などへの応用が期待されており、高純度のヒト iPS 細胞由来心筋細胞の安定した作製の需要は高い。しかしながら、従来の分化誘導方法では、非心筋細胞も混在して誘導されるため、最終段階に非心筋細胞を除く精製過程が必要となっている。

本研究では、非心筋細胞を除く最終精製過程なしに高純度の心筋細胞を作製する新しい分化誘導法を開発を試みた。

まず、ヒト iPS 細胞から中胚葉誘導因子を用いて、心筋細胞への分化能を有する中胚葉細胞集団 (PDGFR $\alpha$  陽性細胞) を誘導および収集した。収集した PDGFR $\alpha$  陽性細胞は、2 種類の Wnt シグナル阻害剤を併用して強力に心筋細胞へ分化誘導することにより、精製過程なしに約 95% の高純度で心筋細胞へと安定して分化した。その後 200 日を超える長期培養においても高純度を維持した。

特性解析では、ほぼ全ての心筋細胞が心室筋特異的のマーカ MLC2v を発現し、長期培養によってサルコメア構造・ミトコンドリアの成熟化、T 管様構造物などの構造的な成熟を示した。同様に電気生理学的解析においても、90% 以上の心筋細胞が心室筋様の活動電位波形を示し、長期培養によって、心室筋細胞の電気生理・薬理学的な成熟化傾向を示した。

以上の研究から見いだされた高純度心筋細胞誘導技術は、今後、心筋細胞の創薬研究や再生医療などへの応用が期待される。

したがって、本論文は博士 ( 医科学 ) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 3 年 7 月 2 9 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降