

京都大学	博士 (医学)	氏 名	辻坂 勇太
論文題目	Purification of human iPSC-derived cells at large scale using microRNA switch and magnetic-activated cell sorting (マイクロ RNA スイッチと磁気活性化セルソーティングを利用したヒト iPSC 細胞由来心筋細胞の大量純化法)		
(論文内容の要旨) 人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を含む多能性幹細胞から種々の細胞種への分化誘導法が開発され、心筋細胞においてもその方法は確立している。しかし、分化誘導した細胞集団においては一定数の非心筋細胞の混入は免れない。心臓領域の再生医療、特に移植治療においては、未分化な細胞の混入を防ぐ必要があるとともに、極めて多数の細胞が必要である。ヒト iPSC 細胞由来心筋細胞 (以下、心筋細胞) では特異的な細胞表面抗原が同定されていないため、抗原抗体法を用いての高度な純化が不可能なことが問題である。 磁気活性化セルソーティング (MACS) 法は、標的細胞表面抗原に対する磁気ビーズが結合した抗体を用いて磁力で標的細胞をトラップし、大量の細胞の短時間での純化が可能な手法である一方である。また、マイクロ RNA (miRNA) スイッチは、標的 miRNA の相補配列とそれに続くマーカータンパクのコーディング配列を持った人工 RNA である。miRNA スイッチを導入された細胞内に標的 miRNA がある場合はマーカータンパクの発現が抑制され、標的 miRNA が無い場合はマーカータンパクが発現するため、特異的な細胞表面抗原を持たない細胞でも miRNA の発現によって細胞の選別や純化が可能である。本研究では、miRNA スイッチと MACS 法を組み合わせ、心筋細胞を短時間で大量に純化する新手法 (miRNA スイッチ MACS 法) を開発した。 ヒト iPSC 細胞から心筋分化誘導プロトコルを用いて作成した細胞集団の内、心筋細胞・非心筋細胞ともに細胞表面抗原である CD4 の発現が無いことを確認した後、マーカータンパクとして CD4 をコードした miRNA スイッチを作成した。標的 miRNA には、心筋細胞特異的に作用することが報告されている miR-208a を使用した (miR-208a-CD4 スイッチ)。miR-208a-CD4 スイッチを細胞集団に対して導入し、抗 CD4 の MACS 抗体を使用し、MACS 法を用いることで非心筋細胞の除去に成功した。miRNA スイッチ MACS 法では約 1.8 億個の心筋細胞を約 30 分で取得可能で、これは従来のフローサイトメーターを用いたソーティング法の約 150 倍の早さであり、純化効率の大幅な改善が可能となった。 miRNA スイッチ MACS 法を用いて純化した心筋細胞を心筋梗塞モデルマウスの心臓へ移植したところ、良好な生着と心機能の改善を認め、将来的な移植治療において有効である可能性が示唆された。さらに、心房筋細胞誘導プロトコル、洞結節細胞誘導プロトコルを用いて分化誘導した心房筋細胞や洞結節細胞に対しても本手法は有効であった。 また、ヒト iPSC 細胞由来インスリン産生細胞に対しても、同細胞特異的な miRNA である miR-375 と CD4 を組み合わせた miR-375-CD4 スイッチを用いて純化することが可能であった。このことから、miRNA スイッチ MACS 法は心筋細胞だけでなく、種々の細胞への応用が可能であることも示唆され、多領域の移植治療を中心とした再生医療での応用が期待される。			

(論文審査の結果の要旨)

心臓領域の再生医療において、ヒト iPSC 細胞由来心筋細胞の利用が期待されているが、特に移植治療では、未分化細胞の混入防止が必須であり、また、極めて多数の細胞が必要となる。しかし、心筋細胞では特異的な細胞表面抗原が同定されておらず、抗原抗体法を用いた高度な純化ができないことが問題である。

磁気活性化セルソーティング (MACS) 法は、特殊な抗体を用いて磁力で標的細胞をトラップし、大量の細胞の短時間での純化が可能な手法である。また、miRNA スイッチは、内因性 miRNA の発現によって細胞を選別や純化する技術である。本研究では、MACS 法と miRNA スイッチを組み合わせ、ヒト iPSC 細胞由来細胞を短時間で大量に純化する新手法 (miRNA スイッチ MACS 法) を開発した。

心筋細胞に特異的な miR-208a を標的としてマーカータンパクに CD4 を用いた miR-208a-CD4 スイッチと、抗 CD4 MACS 抗体を使用することで約 30 分で約 1.8 億個の心筋細胞が取得でき、純化効率を大幅に改善させることができた。

また、本手法で純化した心筋細胞は、マウス心臓へ良好に生着し、心機能を改善させたことから、将来的な移植治療への応用可能性が示唆された。さらに、ヒト iPSC 細胞由来心房筋細胞や洞結節細胞の他、インスリン産生細胞にも、本手法は有効であり、サブタイプ特異的心筋細胞だけでなく、様々な細胞種への応用可能性も示唆された。

以上の研究はヒト iPSC 細胞由来細胞の大量かつ短時間の純化法の解明に貢献し、移植治療などの再生医療に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) 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 6 年 1 月 26 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