

京都大学	博士（医 学）	氏 名	尾 辻 智 美
論文題目	Progressive maturation in contracting cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells: Qualitative effects on electrophysiological responses to drugs （ヒト ES 細胞由来心筋細胞の拍動性維持と成熟化: 電気生理学的な薬物の心毒性評価法における質的向上）		
（論文内容の要旨）			
ヒト胚性幹細胞（hESC; human embryonic stem cells）や近年樹立されたヒト人工多能性幹細胞（hiPSC; human induced pluripotent stem cells）は、あらゆる組織細胞に分化できる多能性を保持したまま培養下で無限に増殖できる細胞株であるため、創薬の安全性試験や細胞移植治療への実用化が期待されている。特に、成人の心筋細胞はほとんど再生能力を保持していないため、ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞（hESC/iPSC-CMs）の実用化が期待されている。その分化誘導法は多くの研究室により確立・改良され、拍動性を有する心筋細胞が取得可能な段階である。しかしながら、一般的に hESC/iPSC-CMs は、胎児性心筋細胞に類似した未成熟な段階に留まり、成人心筋細胞と比べてイオンチャネル機能が不十分である。また、分化誘導後にその自律拍動性が徐々に消失することから、拍動性の維持、機能的な成熟化、機能細胞の純化といった課題が残されている。よって、in vitro において未熟な hESC/iPSC-CMs を機能的に成熟化させる方法の開発を試みた。 最初に、hESC-CMs を容易に選別するため、心筋特異的遺伝子であるヒト αMHC の発現制御領域下で EGFP を発現する遺伝子導入細胞株を樹立した。END-2 共培養系を用いた心筋誘導系で、安定して拍動性 hESC-CMs コロニーを取得できたが、分化誘導後 15 日目頃をピークに徐々に拍動性が減少した。この問題は EGFP 陽性 hESC-CMs コロニーを 2 週間毎定期的に継代することで解消され、少なくとも一年間拍動性を維持できた。この長期再接着培養法で、これまで困難とされていたペースメーカー細胞とその機能を維持することができた。8 ヶ月継代後の hESC-CMs における定量性 RT-PCR 解析で、成熟心筋マーカーおよび多くのイオンチャネル関連遺伝子群で発現量の著しい増加を確認した。パッチクランプ法を用いた電気生理学的解析で、単一の EGFP 陽性 hESC-CM において活動電位の発火、Na 電流、Ca 電流、K 電流（HERG 電流）が検出され、長期再接着培養によってそれぞれのイオンチャネル活性の増強が認められた。細胞外電位記録では、長期培養した拍動性 hESC-CMs コロニーにおいて、HERG チャネル阻害剤による QT 延長を明確に検出した。この長期再接着培養法により取得した hESC-CMs は、QT 延長関連主要分子の HERG および KCNQ1 が高発現に対応し、既存の QT 延長評価試験である hERG 試験で偽陰性となる薬剤に対しても QT 延長を検出できた。また、hESC-CMs の浮遊培養状態は、接着状態で形成されたグローバルな遺伝子の抑制状態を解除し、一過性ではあるが短期間で心筋機能を亢進できることを明らかにした。 これらの結果は、適切な長期再接着培養法と浮遊培養の組合せにより hESC-CMs の機能維持・成熟化を促すことが可能であることを示し、in vivo に近い薬物誘発性 QT 延長を評価できる安全性試験に適した細胞や再生医療に適した細胞の安定供給に貢献する。さらに移植後の長期機能性を予想させると共に、成人の心機能の長期維持機構解明に貢献することが期待される。			

（論文審査の結果の要旨）
ヒト多能性幹細胞由来の心筋細胞は、再生医療や創薬スクリーニング試験への貢献が期待されているが、一般的に胎児性心筋細胞に類似した未成熟な段階に留まり、成人心筋細胞の性質と異なる面がある。本研究は、in vitro において機能的に成熟したヒト ES 細胞由来心筋細胞（hESC-CMs）の取得を試みたものである。
hESC-CMs コロニーを定期的に継代する長期再接着培養法は、少なくとも一年間の拍動性維持を可能とし、これまで困難であった hESC-CMs のペースメーカー細胞とその機能を長期維持できることを明らかとした。また、浮遊培養法は、hESC-CMs の心筋機能を短期間で増強可能であった。これらを組み合わせることで、心筋特異的遺伝子の発現を増加でき、電気生理学的な解析では、Na や K イオンチャネル機能の増強、さらに既知のチャネル阻害剤に対して明確な薬剤応答性を示し、成体心筋細胞に近い反応が取得可能であることを明らかとした。この結果は、長期再接着培養法と浮遊培養法の組み合わせが未熟な hESC-CMs を in vitro において機能的に成熟可能であることを示す。
以上の研究は、成体に近い機能的性質を保持する心筋細胞の安定供給に貢献すると共に、移植後の長期機能性を予想させ、将来の再生医療への応用を目指した基礎医学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、平成 23 年 8 月 15 日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、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