

博士論文

論文題目 ヒト iPS 細胞から効率的かつ
再現性高く心筋細胞を作製する技術の開発

氏名 伊藤 正道

目次

①略語一覧

②要旨

③序文

④材料と方法

⑤結果

⑥考察

⑦引用文献

⑧謝辞

① 略語一覽

ANP atrial natriuretic peptide

APC adenomatous polyposis coli

bFGF basic fibroblast growth factor

BIO 6-bromoindirubin-3'-oxime

BMP bone morphogenetic protein

CBP cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein

DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole

DCM dilated cardiomyopathy

Dkk1 Dickkopf 1

DMEM Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO dimethyl sulfoxide

Dvl Dishevelled

E2 estradiol

ELISA enzyme-linked immunosorbent assay

ES cell embryonic stem cell

FBS fetal bovine serum

Fzd Frizzled

GSK3 glycogen synthase kinase 3

HCM hypertrophic cardiomyopathy

HEK293 cell human embryonic kidney 293 cell

HGF hepatocyte growth factor

IL interleukin

IMDM Iscove's modified Dulbecco's medium

iPS cell induced pluripotent stem cell

IWP inhibitors of Wnt production

IWR inhibitors of Wnt response

KDR kinase insert domain-containing receptor

KSR knockout serum replacement

MEF mouse embryonic fibroblasts

MHC myosin heavy chain

MLC myosin light chain

PBS phosphate buffered saline

PCP planar cell polarity

PDGFR platelet-derived growth factor

RNA ribonucleic acid

ROCK Rho-associated coiled-coil forming kinase

RPMI Roswell park memorial institute medium

HCM hypertrophic cardiomyopathy

RT-PCR reverse transcription polymerase chain reaction

SCF stem cell factor

SSEA stage-specific embryonic antigen

Tcf/Lef T-cell factor/lymphoid enhancer factor

TGF β transforming growth factor

TNF tumor necrosis actor

TNNT2 troponin T type2

TPO thrombopoietin

VCAM vascular cell adhesion molecule

VEGF vascular endothelial growth factor

②要旨

心疾患研究での利用に向け、ヒト iPS 細胞から再現性高く効率よく心筋細胞を分化誘導する技術が望まれている。本研究で私は Wnt シグナルが心臓発生に対して初期には促進的に、後期には抑制的に作用することに着目し、Wnt 活性化剤と Wnt 阻害剤を iPS 細胞に順に作用させて心筋分化誘導を試みた。作用させる化合物の種類と濃度、投与期間を最適化し、低分子化合物のみを使用した効率的で再現性ある心筋分化誘導方法を開発し、複数の iPS 細胞クローンで純度の高い心筋細胞を得ることに成功した。また内胚葉マーカー遺伝子 *Sox17* の発現が分化誘導プロトコルの最適化の手がかりとなりうることを見出した。

③序文

[幹細胞を用いた心疾患研究]

心臓のポンプ機能の中心を担う心筋細胞は、成体においては原則増殖能力を持っていないため、心筋細胞が数多く失われる心筋梗塞や拡張型心筋症などの病気の根本的な治療法は未だに存在しない。またヒトの成体心筋細胞を採取することは技術的に容易でなく、採取した心筋細胞を培養皿上で維持培養することも困難であるため、ヒト心筋細胞を用いて実験を行うことは現実的ではなかった。

心臓や成体内にもともと存在する幹細胞を増殖させ、心筋細胞へ分化させて治療や移植に利用しようとする試みは古くからなされてきた。特に心臓局所に存在すると考えられている心臓幹細胞を同定し増殖させる試みがなされたが

¹、現状では確実にこれらの幹細胞を選別する方法は開発されておらず、実用はまだ困難と考えられる。

ES 細胞や iPS 細胞は人為的に作成される多能性幹細胞であり、無限に増殖する能力と、人体を構成するあらゆる細胞へと分化しうる能力とを兼ね備えており、再生医療の分野での利用が期待されている。ES 細胞は 1998 年に初めてヒトでの作製が報告された²。受精卵の発生初期段階にある胚盤胞の内細胞塊を単離することで確立されるため、樹立の際に一個体の破壊を伴うという倫理的

な問題があった。iPS 細胞は 2007 年にヒトで報告された人工の多能性幹細胞で³、分化した体細胞に「山中因子」と言われる複数の転写因子（Oct3/4, Sox2, Klf4, Myc）を導入することで得られ、ES 細胞とほぼ同等の自己複製能・多分化能を有するが、iPS 細胞は分化した体細胞から作製できるために倫理的な制約を回避している。さらに iPS 細胞には由来となる体細胞と全く同じゲノムを有しているという独自の特性がある。このため、今後循環器領域では (1)移植医療、(2)病態解明・創薬研究、(3)診断・治療の個別化、(4)安全性薬理 などの分野で iPS 細胞を用いた研究が進んでいくと予見される。[図 1]

(1)移植医療； iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞を元の体細胞宿主に移植すれば、移植片は完全に宿主と同一個体由来となるため、拒絶反応が生じにくいと予想される。

(2)病態解明・創薬研究； 遺伝子異常を背景とする疾患の患者から樹立した疾患特異的 iPS 細胞は、疾患の原因となる遺伝子変異を保持しており、疾患モデリングのツールとして使用できる。疾患特異的 iPS 細胞から分化させた心筋細胞を健常者から樹立した iPS 細胞から分化させた心筋細胞と比較して解析することで、疾患発症の過程や病態を明らかにすることができる可能性がある。すでに、病因における遺伝子変異の関与が大きい家族性心筋症⁴や遺伝性不整脈⁵などの疾患で、iPS 細胞由来心筋細胞を用いて病態の一部を再現したとする報

告が相次いでいる。さらに心筋疾患患者由来 iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞に化合物を投与し、試験管内で再現された異常を是正する化合物を探索することで、全く新たな心疾患治療薬の候補化合物を見出せる可能性がある。

(3)診断・治療の個別化； 疾患特異的 iPS 細胞は診断や治療の個別化にも役に立ちうる。近年、心疾患の重症度を判定しうる遺伝子変異の探索⁶や、新規バイオマーカーの探索⁷が積極的に行われている。これまでは患者血漿やゲノム検体を用いて研究が行われてきたが、分化誘導した心筋細胞での遺伝子発現や培養心筋細胞の分泌因子を解析することで、より感度・特異度の高い予後や治療反応性の予測を行える可能性がある。

(4)安全性薬理； これまで、開発段階の薬剤のヒトへの催不整脈性の検討には、HEK293 などの細胞株にヒト心筋細胞に発現するイオンチャネルを強制発現させたモデルでのスクリーニングが主に用いられてきた。iPS 細胞由来心筋細胞は、程度の差はあるもののヒト成体心筋細胞に発現している一連のイオンチャネルを発現しており、これまでの細胞株を用いたモデルよりもより正確に薬剤毒性を評価できると見込まれる⁸。

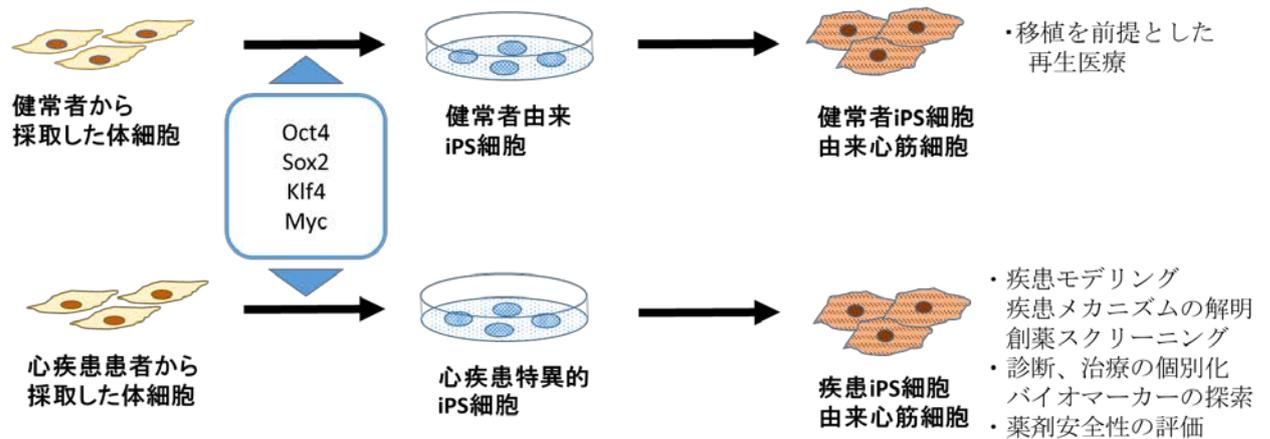


図 1. iPS 細胞由来心筋細胞を用いた循環器疾患研究

iPS 細胞由来心筋細胞は移植治療以外にも循環器疾患での研究利用が可能である。疾患特異的 iPS 細胞は由来体細胞と同一のゲノムを備えていることから、疾患モデリングの研究や、治療・診断の個別化のツールとなる可能性がある。このためには、複数の患者一人一人から、再現性高く均質な心筋細胞を得る方法の開発が不可欠である。

このように、今後循環器領域における幹細胞研究は iPS 細胞を中心に発展していくと考えられるが、iPS 細胞を用いた心疾患研究の最も大きな課題の一つとして、iPS 細胞から効率よく心筋細胞を分化誘導するのが困難なことが挙げられる。なるべく高い効率で均質な心筋細胞を誘導できること、さらに異なる複数の個体由来の iPS 細胞クローンから再現性高く分化誘導でき、かつそれを安価で少ない手間で行えるようになることが望ましい。

[幹細胞からの心筋分化誘導方法の変遷]

2001年に初めてES細胞から心筋細胞が分化誘導されることが示され⁹、以降幹細胞から効率よく心筋細胞を分化誘導する方法について研究が重ねられてきた。ヒトiPS細胞樹立後の2009年には、iPS細胞からもES細胞と同様に心筋細胞を誘導することが可能であると報告され¹⁰、ヒトES細胞で培われた幹細胞の心筋分化誘導技術はiPS細胞にも同様に応用可能であると考えられている。

最初の報告⁹では、ES細胞を浮遊培養すると形成する細胞塊である胚様体 (embryoid body) を血清を含む培地で培養すると、その一部が拍動し心筋細胞が得られることが報告された。続いて、心臓発生時に内胚葉と隣接する領域が予定心臓領域となることから、近位内胚葉に類似した細胞株であるマウス悪性奇形腫細胞株END-2とヒトES細胞を共培養することで心筋分化誘導をもたらす

手法が報告された¹¹。これらの方法では、得られる細胞集団のうち心筋細胞は10-20%程度と効率が低かったため、誘導方法の改善が試みられた。ES細胞は初期胚における胚盤胞の内細胞塊に由来しており、その分化は正常の発生機構を模倣していると考えられる。したがって、心臓の発生過程の各シグナル伝達経路の変化を、サイトカインや成長因子を培地中に加えることで再現する方法が試みられるようになった。

[心臓発生に重要な役割を果たすシグナル伝達経路]

ニワトリ・マウスなどのモデル動物を用いた研究により、心臓発生で主要な役割を果たす液性因子やシグナル伝達経路が明らかにされてきた。心臓の発生では主にTGF β （トランスフォーミング増殖因子） β シグナルとWntシグナルが重要な役割を果たす。図2に示すように、各シグナルの影響を受けながら幹細胞からまず中胚葉細胞が誘導され、心臓中胚葉、心筋前駆細胞、心筋細胞が順に誘導されていく。

TGF β スーパーファミリーは、細胞膜上の TGF β I 型・II 型受容体と、それに続く転写因子 smad のリン酸化による活性化を特徴とする一連のサイトカインであり、細胞増殖の抑制や分化に関与する。

このファミリーに属する Activin は Activin 受容体を活性化し、これによりリン酸化を受けた smad2/3 が smad4 とともに核内に移行することで転写因子として作用し、生理的な作用を発揮する。Activin A は生体では初期前方内胚葉から分泌され、強力に中胚葉を誘導することが知られている¹²。

BMP（骨形態発生タンパク）も TGF β スーパーファミリーに属し、活性化受容体による smad1/5/8 のリン酸化によって smad4 の核内移行が開始する。発生の初期（マウス胎生5.5日）においては BMP2 が前方内胚葉から分泌されることで後述する Wnt3 の発現を亢進させ、中胚葉誘導に働くと考えられている¹³。一方で Yuasa らは、マウスの胎生7日目付近の心臓領域に Noggin と呼ばれる BMP 抑制因子が発現することを見出し、その部位が胎生8日目の心筋細胞特異的転写因子 Nkx2.5 の発現部位と一致することを報告した¹⁴。これは心臓中胚葉誘導後には BMP が心臓前駆細胞誘導に対し抑制的にはたらく可能性を示している。

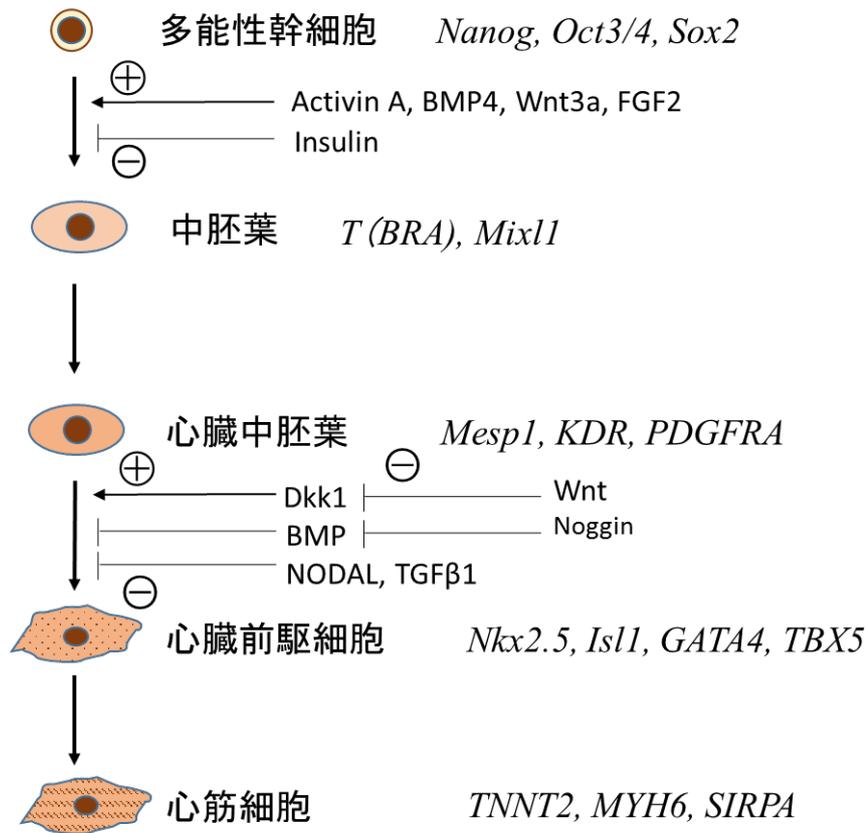


図 2. 心臓発生の各段階と各シグナルの関連の概念図

これまでの動物胚を用いた心臓発生の研究、幹細胞からの心筋細胞分化誘導研究で得られている、心臓発生の各段階の細胞と発生に影響を与えるシグナルの影響の模式図を示す。

イタリック表記は心臓発生の各段階の細胞タイプにおける代表的なマーカー遺伝子である。

Wntシグナルは初期発生や発癌に関与するシグナル伝達系で、心筋分化誘導にも重要な役割を果たす。Wntタンパクは現在19種類、Wnt受容体として10種類の7回膜貫通型受容体Fzdが知られている。Wntにより活性化される細胞内シグナル伝達経路として①古典的Wnt経路、②PCP経路、③Ca経路 が知られている。このうち古典的Wnt経路では、Wntが受容体であるFzdとLRP5/6とで三量体を形成すると、放出されたDvlが細胞質内でAxin, GSK3 β , APCからなる β -catenin分解複合体を抑制することで β -cateninが安定して核内に移行できるようになり、転写因子Tcf/Lefと会合してWntシグナル標的遺伝子を活性化する(図3)。

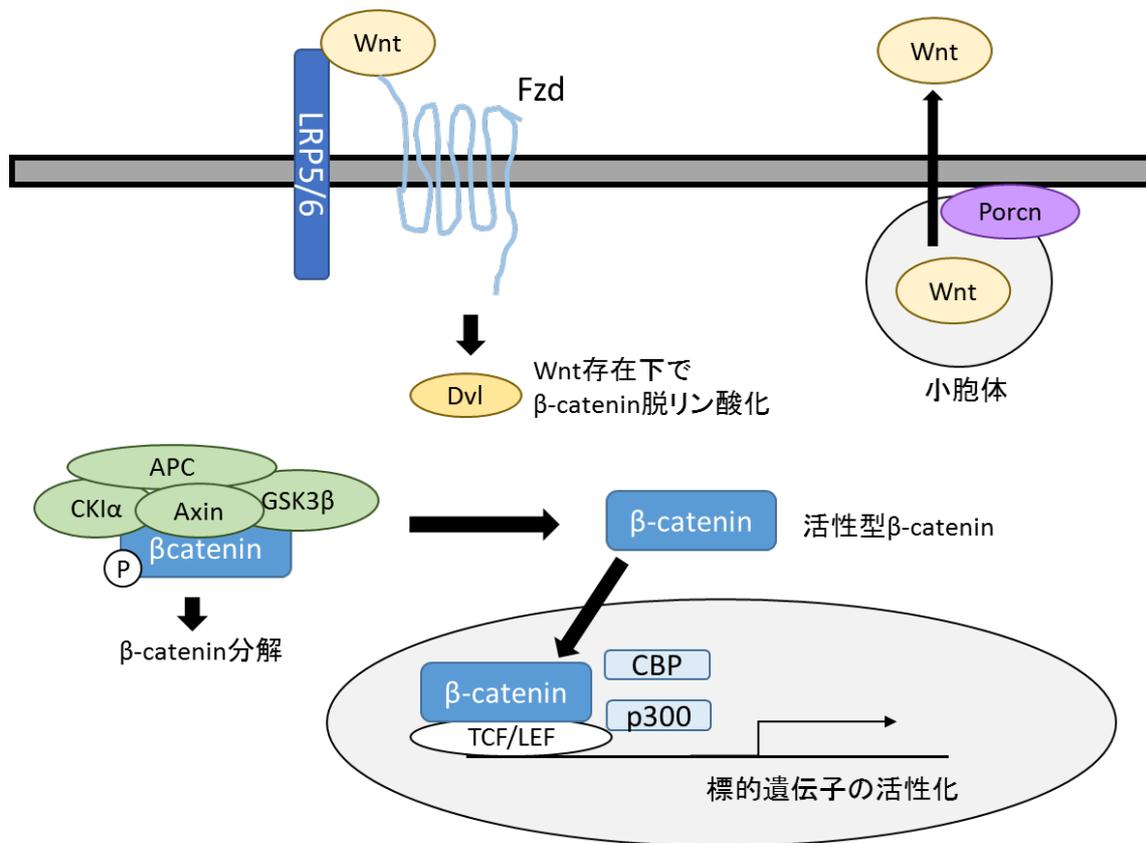


図3. 古典的Wntシグナルの模式図

Wntシグナルの中で、 β -cateninの活性化のより調整される経路を古典的経路と称する。古典的経路では、Wntタンパクが受容体であるFzdとLRP5/6に結合すると細胞質中の β -cateninが安定化し、一部が核内移行して転写因子Tcf/Lefと複合体を形成することで標的遺伝子の発現が誘導される。

古典的Wnt経路は、心筋分化に対して促進的に作用するという報告と抑制的に働くという報告の双方がなされてきた。ショウジョウバエにおいて、Wntとの相同遺伝子であるWgの変異体では原腸陥入前にWgを抑制すると心臓発生が起こらなくなることから、Wntシグナルは心臓発生を促進すると報告された¹⁵。一方でニワトリ胚において、原腸陥入後の予定心臓領域の決定時に胚前方にWntシグナル阻害作用を持つCrescentが発現していることが報告され、Wntシグナルが心臓発生を抑制していると報告された¹⁶。Naitoらはマウス胚性癌細胞株P19細胞やマウスES細胞を用いた実験で、Wntシグナルが発生初期には心筋分化に促進的に作用する一方で、逆に心筋分化後期には抑制的に働くという二相性の作用を示した¹⁷。この報告によりそれまでのWntシグナルの心筋分化における相反する報告が、Wntシグナルが分化誘導に対して持つ作用の時期特異性によるものであると理解された。

[報告されているヒト多能性幹細胞からの心筋分化誘導方法と課題]

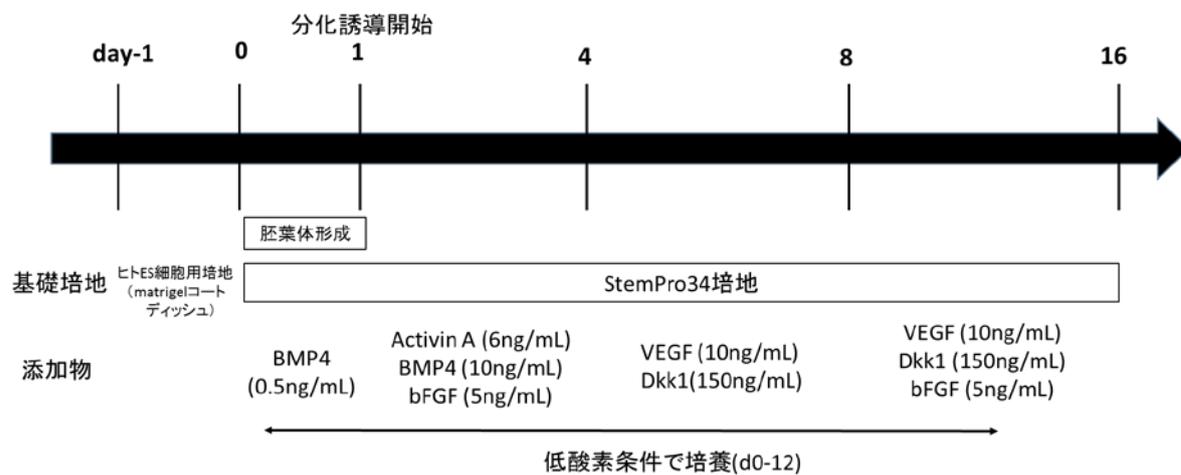
これらの発生学の知見を活かした心筋分化誘導方法の代表的な例を示す¹⁸。

[図4] 2008年Yang, Kellerらにより報告されたこの方法は、胚様体形成により分化誘導を開始し、複数のサイトカインを組み合わせた培養液中で順次胚葉体を培養することで心筋細胞を得る分化誘導方法である。フィーダー細胞上で培養

されているES/iPS細胞を、フィーダー細胞除去のためにマウス肉腫由来タンパク成分からなる細胞外基質マトリゲル(Corning)でコートされたディッシュの上に継代することから分化開始する。翌日、幹細胞数十個からなる細胞塊を作成して低接着皿上への浮遊培養に移行することで胚様体を形成させる。その後、図4に示されたプロトコルに従って化合物を添加したStemPro-34培地(Thermo Fisher)で培地交換を行うことによって心筋分化誘導をすすめる。まず3日間 Activin A 3 ng/mL, BMP4 10 ng/mL, bFGF 5 ng/mLを含む培地で培養した後、4日間 VEGF 10 ng/mL, Dkk1 150 ng/mLを含む培地で培養し、さらに8日間をVEGF 10 ng/mL, Dkk1 150 ng/mL, bFGF 5 ng/mLを含む培地で培養することにより、拍動する心筋細胞を得る。胚様体形成後の12日間を酸素濃度5%以下の低酸素条件で培養することが推奨されている。この分化方法によって、分化開始後16日目に50%程度のTNNT2陽性細胞が得られるとされている。

この方法は、幹細胞から中胚葉を誘導する作用を持つサイトカイン (Activin A, BMP4) を作用させた後、中胚葉から心筋前駆細胞を誘導する作用を持つサイトカイン (Dkk1) を作用させることによって心筋細胞を得るという点で、生理的な発生過程を模倣するプロトコルである。そのためこの報告以前の手法に比べて効率が高いことがメリットとして挙げられる。一方で、使用する成長因

子・サイトカインが多く高価である点、サイトカインは製造元やロットによって活性が異なりうるため、再現性が低いことが問題である。



[胚葉体の形成過程]

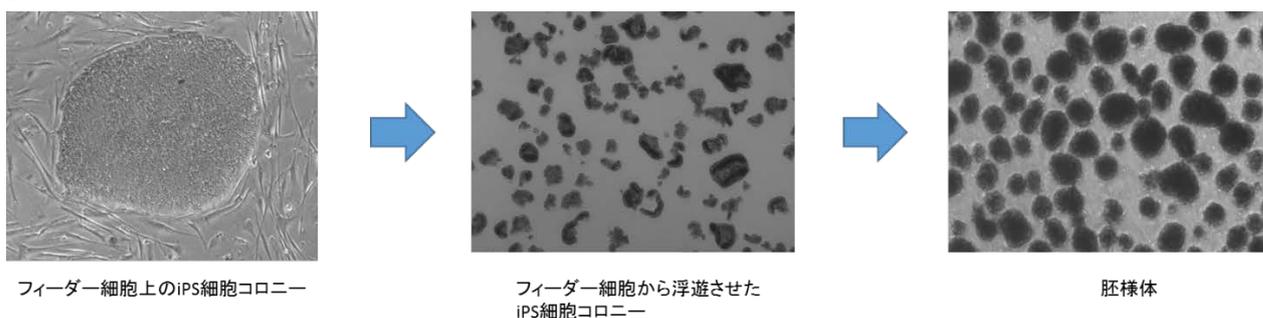


図 4. Yang らによる胚様体法を用いた多能性幹細胞からの心筋分化誘導方法¹⁸

次に Lian らによる方法を示す[図 5]¹⁹。この方法では、幹細胞を単細胞にまで解離し、高密度で単層播種することにより分化誘導を開始する。（この分化誘導開始方法を簡易的に「単層法」と称する。）この方法は培地中への化合物添加により、Wnt シグナルを二相性に操作することで心筋分化誘導をもたらす。

ES/iPS 細胞を継代時に単細胞にまで解離し、フィーダーレス用ヒト多能性幹細胞培地である mTeSR1 (STEMCELL Technologies) に、ROCK 阻害剤である Y27632 5 μM を加えた培地に懸濁してマトリゲルコートした 12 well plate に播種する。（ROCK 阻害剤はシングルセル状態の多能性幹細胞の生存率を向上させるために添加される。）5-15 $\times 10^5$ /well の細胞数で 4 日程度培養し、細胞がコンフルエントに達したら分化誘導を開始する。RPMI 培地+B-27 サプリメント（インスリン(-)）に CHIR99021 (GSK3 β 阻害剤; Wnt シグナルの活性化作用を持つ) 12 μM で追加した培地に交換し、1 日培養する。分化開始 3 日後に RPMI/B-27 培地に IWP2 (Porcupine 阻害剤 ; Wnt シグナル阻害作用を持つ) 5 μM を添加したもので培地交換を行う。以降 RPMI/B-27 培地で 3 日おきに培地交換を継続する。この方法で分化開始約 12 日目頃から拍動細胞が得られ、最終的に 30 日後に 80%以上の細胞が TNNT2 陽性になるとされている。

この方法は、低分子化合物を用いた分化誘導方法であり、サイトカインを用いた方法よりも再現性が高く安価である。一方で、この方法では分化開始時の

細胞播種密度と化合物（CHIR99021）濃度の調整が必要であるとされており、分化誘導の初期条件による結果のばらつきが大きいことが問題である。また技術的な問題として、分化開始時の幹細胞を均一に高密度状態にする必要があり、12 well plate という小スケールでの誘導でなければうまくいかず、二次元培養であることと合わせて最終的な収量が不十分であるという問題がある。

[実験の着眼点、目的]

iPS 細胞を心疾患研究に用いるには、複数の個体由来の iPS 細胞から多くの心筋細胞を得る必要がある。図 4 に示されるようなサイトカインを多数用いる方法は分化誘導の再現性が低く高価であることが問題点である。一方図 5 に示されるような単層法はスケールが小さく最終的な収量が少ないことが短所である。これらの問題を解決するため、独自に新規の心筋分化誘導プロトコルを開発することを検討した。すなわち、スケールの拡大が容易な胚様体法で、サイトカインや血清成分を含まない、低分子化合物を用いた分化誘導方法の開発を試みることにした。

図 4 に示す分化誘導法(以下 Keller 法と称す)を基礎となる方法とし、分化誘導各段階で用いられるサイトカインを順次低分子化合物に切り替えてプロトコルを最適化することを試みた。Wnt シグナルについてはシグナル伝達を促進する化合物・抑制する化合物が複数開発されていることから、胚様体を「Wnt シグナルを活性化する低分子化合物 (Wnt 活性化剤) を含む培地」→「Wnt シグナルを抑制する低分子化合物 (Wnt 阻害剤) を含む培地」の中で順に培養することによって心筋分化誘導を試みた。複数の Wnt 活性化剤・阻害剤の組み合わせの中で、いずれが心筋分化を効率的にもたらすか検討し、最も理想的な化合物の「組み合わせ、濃度、投与期間」を見出すことにした。

この検討の結果、Wnt 活性化剤の中として GSK 阻害剤である CHIR99021 を、Wnt 阻害剤として Porcupine 阻害剤である IWP2 を組み合わせて使用する分化誘導プロトコルが最も効率よく心筋細胞を分化誘導することが判明した。さらに、Wnt 活性化剤 CHIR99021 の分化誘導における至適濃度が 4-5 μ M と狭い範囲にあること、Wnt 活性化剤の最適な使用期間は 2 日間（48 時間）であることを見出した。プロトコル最適化後、複数クローンで分化 16 日目に約 60%の拍動胚様体を得た。また、Wnt 活性化剤の濃度と投与期間を変化させて心筋分化誘導を行い、各段階での遺伝子発現の解析を行うことで、Wnt シグナルの切り替えのタイミングの推定に役立つ遺伝子発現の変化を見出した。

さらに Keller 法における VEGF, bFGF の代替となる化合物として TGF β シグナル阻害剤 SB431542 と estrogen(E2)を見出し、サイトカインフリーの分化誘導方法を開発した。乳酸含有・グルコース不含培地で心筋細胞を精製する手法²⁰を併用することで、TNNT2 陽性率>90%の純度の高い心筋細胞が得られることを確認した。また、誘導された心筋細胞は、既報と比較して心室筋マーカーである MLC2v の陽性割合が高いことが分かった。

最後に、心筋症（肥大型心筋症 HCM, 拡張型心筋症 DCM）患者 3 名ずつから同様に iPS 細胞を樹立して心筋分化誘導を行い、開発したプロトコルでいずれのクローンも心筋分化させうることを確認した。

以上の通り効率よく、再現性高くヒト多能性幹細胞から心筋分化誘導する新規の方法を確立した。

④材料と方法

(1) フィーダー細胞の調整

iPS 細胞を樹立および維持培養するためのフィーダー細胞として、MEF をマイトマイシン C 処理することで細胞分裂能を止めたもの (EmbryoMax primary mouse embryo fibroblasts, stain CF1, mytomycin C treated (Millipore); 以下 M-MEF と称す) を使用した。あらかじめ使用するディッシュ (Greiner) を、0.1% ゼラチン溶液 (Sigma) によって 37°C で 30 分以上コーティングした。M-MEF を 10% FBS (Biowest) 入り DMEM (high glucose) 培地 (Nacalai tesque) に懸濁し、使用するウェルプレート (Greiner) およびディッシュの底面積に応じて、表 1 に記載された培地量・細胞数に従って播種した。播種した M-MEF は 3 日以内に使用した。

表 1. 培養にしたプレートの底面積と培地量・細胞数

	底面積(cm ²)	培地量(mL)	フィーダー細胞数
24well plate	2	0.5	5.0×10 ⁴ 個
6well plate	10	2	2.0×10 ⁵ 個
6cm dish	20	4	4.0×10 ⁵ 個
10cm dish	60	10	1.0×10 ⁶ 個

(2) iPS 細胞の樹立

ヒト末梢血単核球前駆細胞に山中 4 因子を含むエピソーマルプラスミドベクターをエレクトロポレーション法により導入する方法²¹によって iPS 細胞を樹立した。

ヒト iPS 細胞の作製に先立ち、今回の体細胞提供者となった被験者より、iPS 細胞の作製および心筋分化誘導を行うことについて書面にて説明を行い、同意書を取得した。20 代から 30 代の 3 人の健常者ボランティアから採血を行い、単核球細胞を分離培養した(健常 iPS 細胞クローン名 UT-iPS1, 2, 3…のように記す)。また東京大学医学部附属病院循環器内科に通院中の拡張型心筋症

(DCM) および肥大型心筋症 (HCM) の患者からも同様に同意書を取得の後に単核球を分離し、それぞれ 3 名ずつより iPS 細胞の作成を行った (各疾患 iPS 細胞クローン名 を DCM-iPS1, 2, 3…、HCM-iPS1,2,3…のように記す)。実験の遂行に当たっては採取後のサンプルの匿名化を適切に行い、個人情報の保護に十分配慮した。なお患者から検体を取得し iPS 細胞を作製することは、当科の研究「iPS 細胞を用いた難治性循環器疾患の病態解明および治療法開発研究」の中で東京大学医学部附属病院倫理委員会に申請し、承認を得ている。

(審査番号 G10019)

(i)ヒト末梢血からの単核球の分離

末梢血を 10 mL 採血し、PBS(-) (Nacalai tesque)10 mL を加え希釈した後、希釈血液を 5 mL ずつ Ficoll-Paque Premium (GE life science) 5 mL を分注した 15 mL 遠沈管(Greiner) 4 本それぞれに静かに重層した。400×g、18 °Cで 30 分間遠心を行った後、単核球を多く含む中間層をピペットマンによって回収し (各チューブから約 1 mL ずつ回収できる)、50 mL 遠沈管 1 本に回収した。単核球 4 mL に PBS(-) 26 mL を加え 200×g, 18 °Cで 10 分間遠心し、上清を除いた後細胞数をカウントした。得られた単核球細胞のうち 3.0×10^6 個を、血球培養用培地 (※)2 mL に懸濁し、6 well plate に播種して 37 °C, 5%CO₂ の条件で 6 日間培養した。

※血球培養用培地： StemSpan H3000 (STEM CELL Technologies) に、IL-6 (Cell Guidance System)を 100 ng/mL、SCF (Cell Guidance System)を 300 ng/mL、TPO (Cell Guidance System)を 300 ng/mL、Flt3 ligand (Cell Guidance System) を 300 ng/mL、IL-3 (Cell Guidance System) 10 ng/mL で含有するように添加したものの。

(ii)樹立用フィーダー細胞の準備

エレクトロポレーション前日に、6 well plate に M-MEF を播種した。

(iii)単核球へのエレクトロポレーションによるエピソーマルプラスミドの導入

6日間培養した単核球細胞を回収し、細胞数をカウントして 1×10^6 個の細胞を遺伝子導入に使用した。

まず以下のエレクトロポレーション用溶液を作成した。プラスミドベクターは Addgene 社 (http://www.addgene.org/Shinya_Yamanaka) より入手し、DNA 濃度 $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ となるように調整した。

[エレクトロポレーション溶液]

• P3 Primary Cell 4D-Nucleofector solution (Lonza) 81.8 μL

• Supplement (Lonza) 18.2 μL

• episomal plasmid 合計 3 μL

pCXLE-hOCT3/4-shp53-F 0.83 μg

pCXLE-hSK 0.83 μg

pCXLE-hUL 0.83 μg

pCXWB-EBNA1 0.5 μg

作成したエレクトロポレーション溶液に培養した単核球 1×10^6 個を懸濁し、キュベットに懸濁液を入れ、速やかに Nucleofector 4D (Lonza) でエレクトロポレーションを行った (プログラム EO-100)。

エレクトロポレーション後、細胞を速やかに用意しておいた血球培養用培地に懸濁し、M-MEF を播種した 6well plate に各 well あたり単核球 2.0×10^5 個ずつ播種した。

(iv) 培地追加および交換

遺伝子導入後 2 日目に、Primate ES cell medium (ReproCELL) に bFGF-2 (ReproCELL) を終濃度 40 ng/mL で添加したもの (以下ヒト iPS 細胞用培地と呼ぶ) を各 well あたり 1.5 mL ずつ添加した。同様に 4 日目、6 日目にも 1.5 mL ずつヒト iPS 細胞用培地を添加した。8 日目に培地をすべて吸引除去し、2 mL/well で培地を添加した。以降は 1 日おきに同様に培地交換を行った。

(v) iPS 細胞コロニーのピックアップ

遺伝子導入後およそ 12-15 日目から、ES 細胞様コロニーが出現した。コロニーは 6well plate 各 well から 10 個程度ずつ出現した。コロニーが肉眼で確認できるようになったら、分化が始まる前にピックアップを行った。実体顕微鏡での観察下にコロニーを 1 つずつプレートから剥がし、新しく播種した M-MEF の上に移して拡大培養を行った。

(3) iPS 細胞の維持および継代方法

iPS 細胞は 37 °C、5% 二酸化炭素の条件下で培養を行った。継代翌日を除き、毎日ヒト iPS 細胞用培地で培地交換した。

iPS 細胞が増殖して 80%コンフルエントに達する前に継代を行った。以下、10 cm dish で継代操作を行う場合について記載する。培地を除去し、PBS(-) 5 mL でプレートを 2 回洗浄した後、CTK 溶液 (collagenase type IV (Thermo Fisher Scientific) 最終濃度 1 mg/mL, trypsin (BD) 最終濃度 0.25%, Knockout Serum Replacement (Thermo Fisher Scientific) 最終濃度 20%, CaCl₂ (Sigma) 最終濃度 1 mM からなる細胞解離用溶液) を 2 mL ディッシュに添加し、37°C で 3-5 分インキュベートした。フィーダー細胞の大半がはがれ、iPS 細胞コロニーの周囲がめくれるように剥離してきたら CTK 溶液を吸引除去し、PBS(-) 5 mL で 2 回洗浄した。2 mL のヒト iPS 細胞用培地を加えてセルスクレーパーでコロニーを掻き取り、15 mL 遠沈管に iPS 細胞コロニーを回収した。P1000 ピペットで注意深くコロニーを砕き、50-100 個程度の小さな塊になるように大きさを整えた。これを新たなヒト iPS 細胞用培地に懸濁し、M-MEF を播種したディッシュ上に播種した。

今回使用したクローンは、1:3-1:5 の比で、3-5 日の間隔で継代を行った。

(4) iPS 細胞の未分化マーカー免疫染色

iPS 細胞コロニーの未分化状態の検定のために、細胞の形態の記録と評価に加えて、未分化マーカー5種類が陽性となることを免疫細胞化学蛍光染色で示した。

iPS 細胞の継代3日後、培地を除去して PBS(-)で洗浄し、4%パラホルムアルデヒド(Nacalai tesque)で常温10分間インキュベートすることで細胞の固定を行った。固定後パラホルムアルデヒドを除去して PBS(-)で2回細胞を洗浄し、続いて0.2% Triton X-100(Wako) /PBS(-) を加えて常温で10分間インキュベートし、細胞の透徹を行った。細胞を PBS(-)で2回洗浄した後5% normal goat serum (Wako) /PBS(-)を加えて常温30分間静置し、ブロッキングを行った。ブロッキング後一次抗体液をディッシュに添加し、4°Cで一晩インキュベートした。翌日、一次抗体液を除去して PBS(-)で細胞を2度洗浄し、対応する二次抗体希釈液を入れて常温遮光下に1時間インキュベートした。細胞を PBS(-)で洗浄後カバーガラスをかけ、核染色剤入りの封入剤である ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI (Thermo Fisher Scientific)によって細胞を封入した。作成したサンプルは、共焦点レーザー顕微鏡 LSM 510 (Zeiss) によって撮影を行い、画像を取得した。

一次抗体・二次抗体は1% normal goat serum/PBS(-)によって指定の希釈率で希釈し使用した。抗体の情報は以下の通りである。

[一次抗体]

- anti-Oct3/4: (sc-5279, Santa Cruz) 1:300 の希釈率で使用
- anti-Nanog: (RCAB003P, ReproCELL) 1:200 の希釈率で使用
- anti-SOX2: (AB5603, Merck Millipore) 1:300 の希釈率で使用
- anti-SSEA-4: (MAB4304, Merck Millipore) 1:300 の希釈率で使用
- anti-TRA-1-60: (MAB4360, Merck Millipore) 1:300 の希釈率で使用

[二次抗体] すべて 1:300 の希釈率で使用

- Oct3/4: Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG(H+L) (Thermo Fisher Scientific)
- Nanog: Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG(H+L) (Thermo Fisher Scientific),
- SOX2: Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG(H+L) (Thermo Fisher Scientific)
- SSEA-4: Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG(H+L) (Thermo Fisher Scientific)
- TRA-1-60: Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgM mu chain (Abcam),

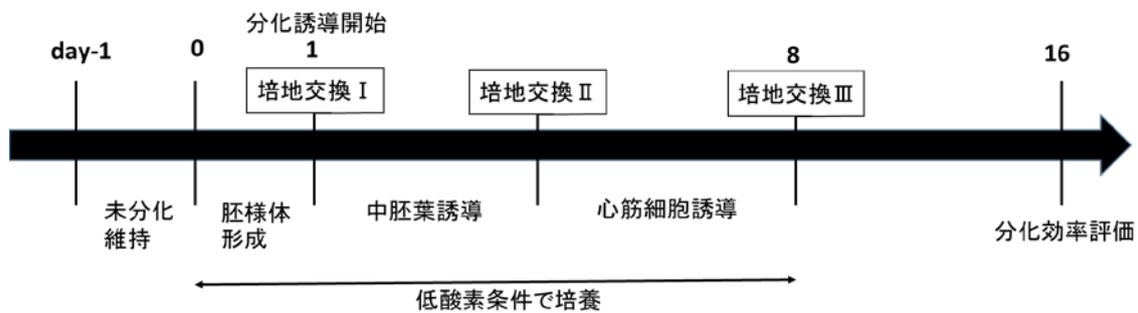
(5) 心筋細胞の分化誘導方法

Keller 法(図 4)に基づき胚様体法で分化誘導を開始し、以下の 3 点を検討した。概略を図 6 に示す。

検討項目①；最も効率のよい心筋分化をもたらす Wnt 活性化剤(X)の種類と濃度を同定する。

検討項目②；最も効率のよい心筋分化をもたらす Wnt 阻害剤(Y)の種類と濃度を同定する。

検討項目③；最も効率のよい心筋分化をもたらす Wnt 活性化・阻害剤の切り替えのタイミングを同定する。



	胚様体形成	培地交換 I	培地交換 II	培地交換 III
基礎培地	Repro FF2	Modified Stempro	Modified Stempro	Modified Stempro
添加化合物	Y27632 5 μ M	Wnt活性化剤X	Wnt阻害剤Y VEGF 10ng/mL	VEGF 10ng/mL bFGF 5ng/mL

- 検討事項① 最も良い心筋分化誘導効率をもたらすWnt活性化剤Xの種類と濃度の同定
 検討事項② 最も良い心筋分化誘導効率をもたらすWnt阻害剤Yの種類と濃度の同定
 検討事項③ 最も良い心筋分化誘導効率をもたらすシグナルの切り替えのタイミングの同定

図 6. 新規心筋分化誘導法の開発の手順と検討項目の概略

低分子化合物の組み合わせによる新しいプロトコルを開発し最適化するため、以下の3点を検討した。

検討事項① 最も良い心筋分化誘導効率をもたらす Wnt 活性化剤 X の種類と濃度を同定する。

検討事項② 最も良い心筋分化誘導効率をもたらす Wnt 阻害剤 Y の種類と濃度を同定する。

検討事項③ 最も良い心筋分化誘導効率をもたらすシグナルの切り替えのタイミングを同定する。

基本とした分化誘導実験の方法の詳細は以下の通りである。これらを UT-iPS1-1, UT-iPS2-1 の 2 つの iPS 細胞クローンを用いて検討した。

(i)胚様体の形成=分化 0 日目

10 cm dish に継代後 3-5 日が経過し、70-80%コンフルエントに達した iPS 細胞を分化誘導実験に使用した。iPS 細胞は継代数 10 から 50 のものを用いた。iPS 細胞コロニーを、継代時と同様の操作によってディッシュから剥がし、15 mL の遠沈管に回収した。コロニーを、Y27632 (Wako) 5 μ M を添加したフィーダーレス用ヒト多能性幹細胞培地 Repro FF2 (ReproCELL) 10 mL に再懸濁し、P1000 ピペットを用いて注意深くコロニーを砕いて 50-100 個程度の小さな塊になるように大きさを整え、10 cm ペトリディッシュ(Greiner) に 1:1 で播種した。播種後、マルチガスインキュベーターで、37°C・5%O₂・5%CO₂ の低酸素条件で培養開始した。

(ii)培地交換 I

胚様体形成後、Wnt 活性化剤 X を含む培地に交換した。

分化誘導に使用する基礎培地は以下の通りであり、これを以降 modified StemPro 培地と称する。

[心筋分化誘導培地 modified StemPro 培地組成]

StemPro-34 SFM medium (1x) (Gibco) 500 mL

StemPro-nutrient supplement (Gibco) 13 mL

Glutamax (Gibco) 最終濃度 1%

Monothioglycerol (Sigma) 最終濃度 0.45 mM

Transferrin (Roche) 最終濃度 150 µg/mL

Ascorbic acid (Sigma) 最終濃度 50 µg/mL

形成した胚様体を 15 mL 遠沈管に回収した後 5 分静置し、上清を除去した後
IMDM 培地 (Nacalai tesque) 10 mL を加えることで胚様体を洗浄した。再度 5 分
静置した後上清を除去し、modified StemPro 培地に Wnt 活性化剤 X を指定濃度
加えた培地に再懸濁した。10 cm dish 由来の胚様体を低接着加工済み 6well
plate(Corning) の 6well 分または 25 cm² 低接着フラスコ(corning) 2 本に播種し
て、5%の低酸素条件で浮遊培養を継続した。化合物 X のリストは表 2 に示
す。

(iii)培地交換 II

胚様体を 15ml 遠沈管に回収した後 5 分静置し、上清を吸引除去した後、
IMDM 培地 (Nacalai tesque) を加えて胚様体を洗浄した。再度 5 分静置した後
上清を除去し、modified StemPro 培地に Wnt 阻害剤 Y を指定濃度、および

VEGF 10 ng/mL(Wako)含む培地に再懸濁して、もとの低接着加工済み 6well plate または 25 cm² 低接着フラスコに戻して低酸素条件で浮遊培養を継続した。

化合物 Y のリストは次項(6)に示す。

(iv)培地交換Ⅲ 分化 8, 12, 16, 20 日目

分化 8 日目以降は 4 日おきに以下の手順で 20 日目まで培地交換した。胚様体を 15 ml 遠沈管に回収した後 5 分静置し、上清を吸引除去した後、IMDM 培地を加えて胚様体を洗浄した。再度 5 分静置した後上清を除去し、modified StemPro 培地に VEGF 10 ng/mL および bFGF 5 ng/mL 含む培地に再懸濁し、もとの低接着加工済み 6well plate または 25 cm² 低接着フラスコに戻して浮遊培養を継続した。8 日目以降は 37°C・5%CO₂ の条件で培養した。

(v)心筋分化効率の測定

分化開始後 16 日目に胚様体を位相差顕微鏡で観察した。ランダムに 50 個の胚様体をカウントし、その中で拍動している胚様体の割合を記録した。

(vi)Wnt シグナルに作用する化合物 X, Y

今回使用した化合物 Wnt シグナル活性化に用いた化合物のリストを表 2 に、また作用機序の明らかなものについてはその作用点に関する模式図を図 7 に示す。

表 2. 検討に使用した Wnt 活性化剤、Wnt 阻害剤のリスト

	化合物名	作用機序	Wnt シグナルへの影響
1	CHIR99021	GSK3 阻害剤 (β -catenin 分解複合体を阻害)	活性化
2	BIO	GSK3 阻害剤 ²² (β -catenin 分解複合体を阻害)	活性化
3	Wnt agonist (BML-284)	不明 ²³ (GSK3 阻害作用なし)	活性化
4	Wnt agonist II (SKL2001)	β -catenin と Axin の相互作用を 阻害 ²⁴	活性化
5	IQ-1	PP2A 阻害剤 ²⁵ (β -catenin と CBP の結合を促進)	CBP 依存的な転写を促進/ P300 依存的な転写を抑制
6	ICG001	β -catenin と CBP の結合を阻害 ²⁶	CBP 依存的な転写を阻害/ P300 依存的な転写を活性化
7	IWP2	porcupine 阻害剤 ²⁷ (内因性の Wnt 分泌を阻害)	抑制
8	IWR1	Tankyrase 阻害剤 ²⁸ (Axin 複合体の安定化)	抑制
9	XAV939	Tankyrase 阻害剤 ²⁹ (Axin 複合体の安定化)	抑制
10	KY02111	機序不明 ³⁰	抑制

Wnt シグナル活性化剤 X として番号 1-6 の化合物を、Wnt シグナル阻害剤 Y として番号 7-10 を使用した。

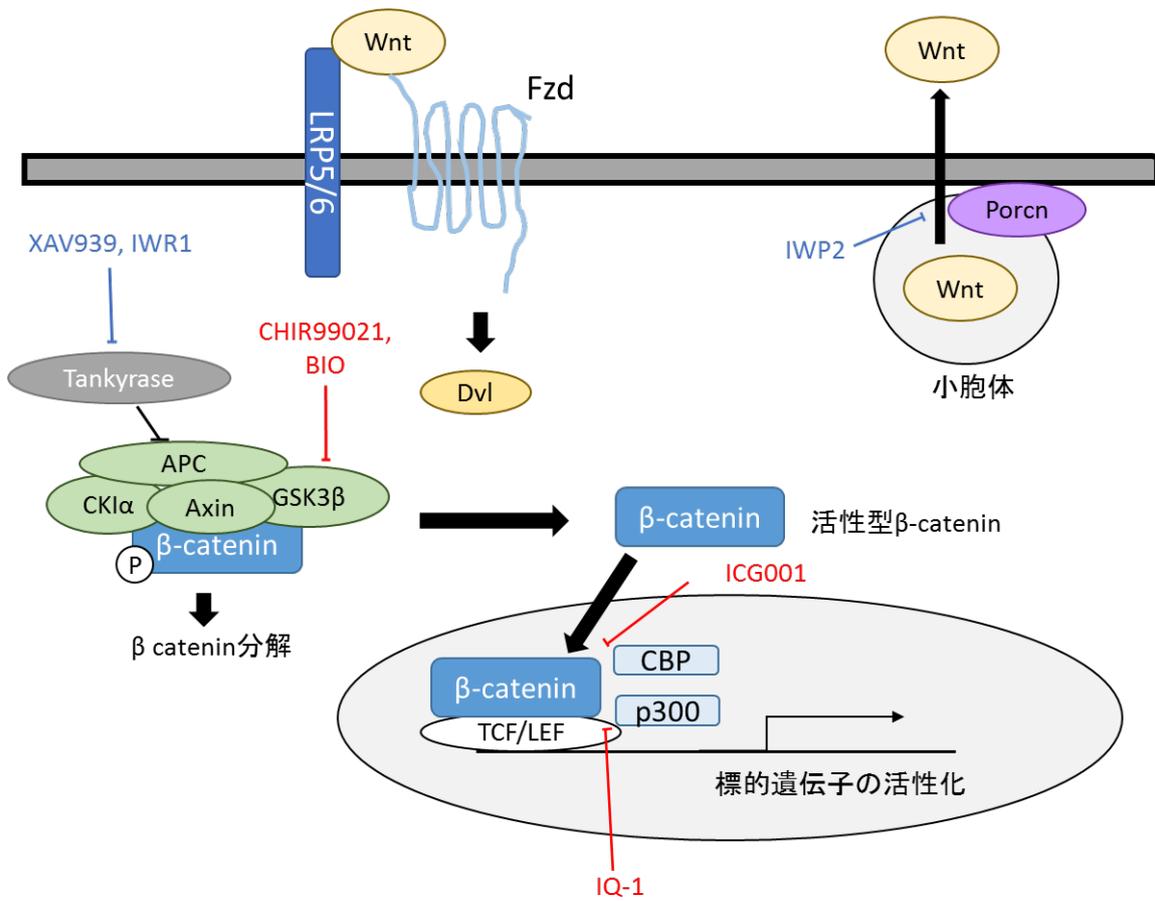


図7. Wnt シグナルに作用する化合物の機序

作用機序が既知の化合物のみを記す。赤字は Wnt シグナルの活性化剤、青字は Wnt シグナルの阻害剤を指す。

[検討事項①] Wnt 活性化剤 X として CHIR99021 (Tocris), BIO (Tocris), Wnt agonist (Millipore), Wnt agonist II (Millipore)を比較した。まず細胞毒性のない至適濃度帯を把握するため、各化合物を 0.1/ 1/ 10 μM で使用し、分化誘導 8 日目に胚様体の残存有無を検討した。続いて胚様体が残存する条件周辺でさらに細かい濃度帯を検討した。IQ-1 (Millipore)と ICG001 (AdoQ Bioscience)は、転写のコアキニターでヒストンアセチル化酵素複合体を形成する CBP または p300 と β -catenin の結合様式を変化させる化合物で、 β -catenin 依存的な転写の様式を変化させる化合物であり、他の Wnt 活性化剤と機序が異なるため、他の Wnt 活性化剤との併用を試みた (1-5 μM)。Wnt 活性化剤 X の検討実験では、暫定的に Y に IWP2(Wako) 5 μM を使用した。コントロールとして溶媒である DMSO (Sigma) 0.1%のみを添加した条件を設定した。

[検討事項②] ①で最も効率のよい化合物 X を同定した後、X をその化合物に固定し Wnt シグナル阻害剤 Y を比較検討した。Y には IWP2, IWR1 (Millipore), XAV939 (Cayman), KY02111(Tocris)を使用した。これらは 2,5,10 μM でまず検討を行い、続いて効果の高かった濃度帯により適宜濃度を変えて再実験を行った。

(vii)Wnt シグナルの切り替えのタイミングの検討

[検討事項③] 過去の心筋分化誘導の報告では、中胚葉誘導に相当する期間は 1 日から 3 日のものが存在する。前項(vi)において最適化した化合物 X, Y を用いて、方法(5)の(ii)に示した培地交換 I のタイミング、(iii)に示した培地交換 II のタイミングを変化させ、心筋分化効率を最適化するスケジュールを検討した。胚様体形成開始日を 0 日目とし、培地交換 I・II の日程を以下のように変更して最終的な分化効率を比較した。

スケジュール 1: 1 日目/3 日目, スケジュール 2: 1 日目/4 日目,

スケジュール 3: 1 日目/2 日目, スケジュール 4: 2 日目/4 日目

(6) RNA の抽出、定量的 RT-PCR

分化過程の胚様体を回収し、TRIzol reagent (Invitrogen)を用いて total RNA を抽出した。QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN)を用いて DNase 処理および逆転写反応を行った。定量的 RT-PCR は、Universal Probe Library (UPL) (Roche)と、Light Cycler Taqman Master Kit (Roche)を用いて PCR 反応および解析を行った。プライマーの配列および対応する UPL のプローブナンバーは Roche 社のオンラインプログラム

(<https://lifescience.roche.com/webapp/wcs/stores/servlet/CategoryDisplay?tab=Assay+Design+Center&identifier=Universal+Probe+Library&langId=-1>)を用いて設計した。*ACTNB* (β -actin)遺伝子をコントロール遺伝子とし、 $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて各遺伝子の相対発現量を算出して示した。プライマーの配列を表3に示す。

表 4. 定量的 RT-PCR に使用したプライマーのリスト

<i>ACTNB</i>	Fwd	ccaaccgcgagaagatga
	Rev	ccagaggcgtacagggatag
<i>NANOG</i>	Fwd	gagatgcctcacacggagac
	Rev	agggctgctctgaataagca
<i>POU5F1</i>	Fwd	cttcgcaagcctcatttc
	Rev	gagaaggcgaaatccgaag
<i>Sox2</i>	Fwd	gggggaatggaccttgatag
	Rev	gcaaagctcctaccgtacca
<i>PAX6</i>	Fwd	gcaggaggaagtgtttgct
	Rev	atgttgctgggttggtgtg
<i>Nestin</i>	Fwd	tacacccgatcctggaag
	Rev	tagcctcctgactccctca
<i>Sox1</i>	Fwd	accaggccatggatgaag
	Rev	cttaattgctgggaattgg
<i>T</i>	Fwd	gctgtgacaggtagccaacc
	Rev	catgcaggtgagttgtcagaa

<i>FOXA2</i>	Fwd	cgttccgggtctgaactg
	Rev	accgctcccagcactacttt
<i>AFP</i>	Fwd	tgactcagagataagtttagctgac
	Rev	tccttgtaagtgcttcttgaac
<i>PDX1</i>	Fwd	cacatccctgcctcctac
	Rev	gaagagccggcttctctaaac
<i>Sox17</i>	Fwd	acgccgagttgagcaaga
	Rev	tctgctcctccacgaag
<i>Nkx2.5</i>	Fwd	cacctcaacagctccctgac
	Rev	aatgcaaaatccaggggact
<i>Mesp1</i>	Fwd	ctgttgagacctggatgc
	Rev	cgtcagttgtccttctcac
<i>MYH6</i>	Fwd	acaccctgactaaggccaaa
	Rev	gtccatgcgacaccttt
<i>TNNT2</i>	Fwd	tggaggcagagaagttcgac
	Rev	cctgtttcggagAACattgat
<i>Axin2</i>	Fwd	gctgacggatgattccatgt
	Rev	actgccacacgataaggag
<i>LEF1</i>	Fwd	cagtcgacacttccatgtcc
	Rev	gagggatgccagttgtgtg

(7) サイトカインを用いない心筋分化誘導方法の確立

完全にサイトカインを含まない心筋分化誘導を達成するため、Keller法で使用される VEGF, bFGF の置換を試みた。そのため心筋分化誘導に好ましい影響を与える低分子化合物を既報から検討した。Dorsomorphin³¹ や Noggin¹⁴ などの BMP 阻害剤、SB431542³² などの TGF β 阻害剤は心筋分化の中胚葉誘導後に添加することで分化効率が向上することが報告されており、これらのうち低分子化合物である SB431542 を分化後期、すなわち Wnt 阻害剤を添加するタイミングで投与することを試みた。また、VEGF の転写活性を促進する因子を検討した報告³³ から、estrogen (17 β エストラジオール; E2) がプロモーターの Sp1 領域に結合して VEGF の発現を上昇させていること³⁴ に着目し、VEGF の代わりに E2 を添加することとした。

分化 3 日目以降に VEGF、分化 8 日目以降に VEGF および bFGF を用いる従来のプロトコル (添加化合物セット①) に加え、以下の 2 プロトコル②③を設定し、3 条件で分化 16 日目に効率を比較した。この実験には UT-iPS 2-2 クローンを使用した。

(i) 分化 3 日目以降、Wnt 阻害剤のみを使用する。VEGF・bFGF は添加せず、代替化合物も使用しない。(添加化合物セット②)

(ii)分化3日目から6日目まで、TGFβ阻害剤 SB431542 5 μM と E2 100 nM を添加する。分化8日目以降は E2 100 nM のみを添加する。(添加化合物セット

③)

(8) 乳酸含有・グルコース不含培地を用いた心筋細胞の *in vitro* 純化方法と胚様体の解離方法

iPS 細胞由来心筋細胞が、非心筋細胞と異なり乳酸を代謝に利用できる特性に基づいて心筋細胞を純化する方法が報告されており²⁰、この方法に従って心筋細胞の純化を試みた。

分化20日目に胚様体を遠沈管に回収し、DMEM(no glucose)培地 (Nacalai Tesque)で一度洗浄した後、DMEM(no glucose)に4 mM の乳酸(Wako)を加えた培地に再懸濁し、8日間(28日目まで)培養継続した。24日目に同様に一度4 mM 乳酸入り DMEM(no glucose)培地で培地交換を行った。

28日目に培地を2% FBS 入り DMEM(high glucose)培地に交換し、以降以下の手順で単細胞にまで解離して以降の解析に用いた。まず胚様体を遠沈管に回収し、300×g で5分間遠心後上清を除去した。PBS(-)で胚様体を1回洗浄した後、0.25% Trypsin/EDTA (Gibco)溶液を加え、37°Cウォーターバスで10分間イ

ンキュベートした。10分後4倍量の10% FBS含有DMEM(high glucose)培地を加え、0.44 μm ストレーナー(BD)を通した後に細胞数をカウントした。

(9) フローサイトメトリーによる iPS 細胞由来心筋細胞の評価

iPS 細胞由来心筋細胞 $1-5 \times 10^5$ 個からなるペレットをよくタッピングし、BD Cytotfix/Perm kit (BD)の Fix/Perm 溶液 250 μL を加えて氷上で20分静置した(固定・透徹)。その後同 kit の Perm/Wash 溶液で2回洗浄し、Perm/Wash 溶液 50 μL に懸濁した後、一次抗体 (anti Troponin T, cardiac isoform 13-11, NeoMarkers, MS-295-PABX)を 1:100 で添加し 4°C で30分 incubate した。Perm/Wash 溶液 1mL で2回洗浄したあと、100 μL の Perm/Wash 溶液に再懸濁し、二次抗体 (Alexa Fluor 488 conjugate Goat anti Mouse IgG; Invitrogen) を 1:1000 で添加し、暗所・ 4°C で30分インキュベートした。その後5% FBS入り PBS(-) 500 μL に懸濁し、0.44 μm セルストレーナーを通してフローサイトメトリー解析に使用した。機械は FACS VERSE (BD)を使用して実験・解析を行った。

(10) iPS 細胞由来心筋細胞の免疫染色

(8)の操作で単細胞に解離した心筋細胞を、0.1%ゼラチン溶液で 37°C 、30分以上コーティングした 4well チャンバースライドに 1×10^4 /well で播種した。2日

後、培地を除去して PBS(-)で洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで常温 10 分間インキュベートした。固定後パラホルムアルデヒドを除去して PBS(-)で 2 回細胞を洗浄し、続いて 0.1% Triton X-100 (Wako)含有 PBS(-) を加えて常温で 5 分間インキュベートし、透徹した。透徹後の操作は iPS 細胞コロニーの免疫染色と同様に行った。

免疫染色には以下の抗体を使用した。

一次抗体;

- MLC2a (Mouse IgG2b, SPS SY, 311011) 1:200
- MLC2v (Rabbit IgG, Proteintech, 10906-1-AP) 1:200
- Troponin T, cardiac isoform 13-11(Mouse IgG1, NeoMarkers, MS-295-PABX) 1:400

二次抗体 ; すべて 1:500 で使用

- Alexa Fluor 546 conjugate Goat anti Mouse IgG2b (Invitrogen)
- Alexa Fluor 488 conjugate Goat anti Rabbit IgG (Invitrogen)
- Alexa Fluor 647 conjugate Goat anti Mouse IgG1 (Invitrogen)

作成したスライドは、共焦点レーザー顕微鏡 LSM 510 (Zeiss)によって撮影を行い、画像を取得した。同じ撮影条件で 10 倍の倍率でランダムに 4 か所撮影を行い、陽性細胞をカウントした。

(11) データの統計処理

複数回施行した実験のデータは、平均値±標準偏差で記載した。平均値の比較の際は、2群の場合は Mann-Whitney の U 検定を用い、3群以上の場合は Kruskal-Wallis 検定を用いた。統計解析ソフトである GraphPad Prism 6(GraphPad Prism Inc., MDF)を使用した。有意差検定の際の p 値を算出し、 $p < 0.05$ の場合に *, $p < 0.01$ の場合**, $P < 0.001$ の場合***を記すことで表記した。有意な差がない ($p > 0.05$)場合は p 値そのものをグラフに併記した。

⑤結果

エピソーマル法によるヒト iPS 細胞の樹立

異なる 3 名の健常者および拡張型心筋症患者、肥大型心筋症患者（合計 9 名）の単核球細胞から、それぞれ 4 クローン以上の iPS 細胞クローンを樹立した。樹立した iPS 細胞はいずれも典型的な ES 細胞コロニー様形態を示した。すなわち、境界明瞭で核・細胞質比の大きい、扁平なコロニーが観察された。[図 8] また、iPS 細胞の未分化マーカーの染色を行い、Oct3/4, Nanog, Sox2, SSEA4, Tra-1-60 が陽性であることを確認した。[図 9]

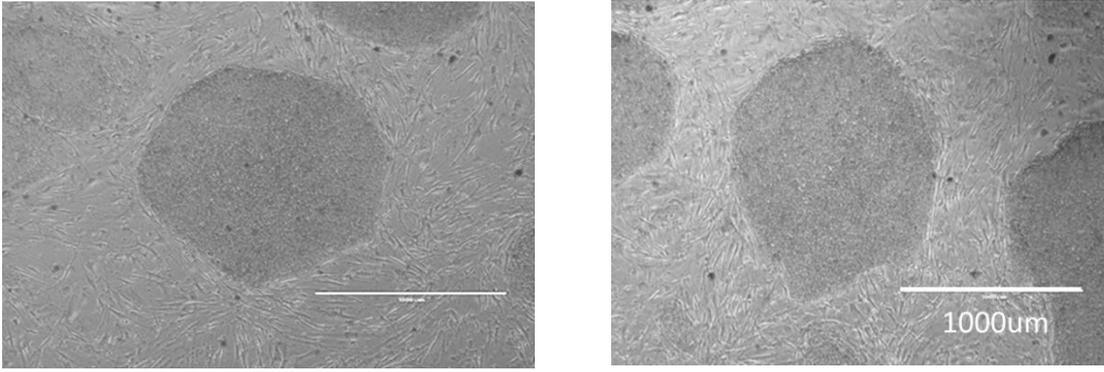


図 8. 樹立した iPS 細胞のコロニーの写真

(左) UT-iPS1-1 クローン

(右) UT-iPS2-1 クローン スケールバーは 1000 μ m。

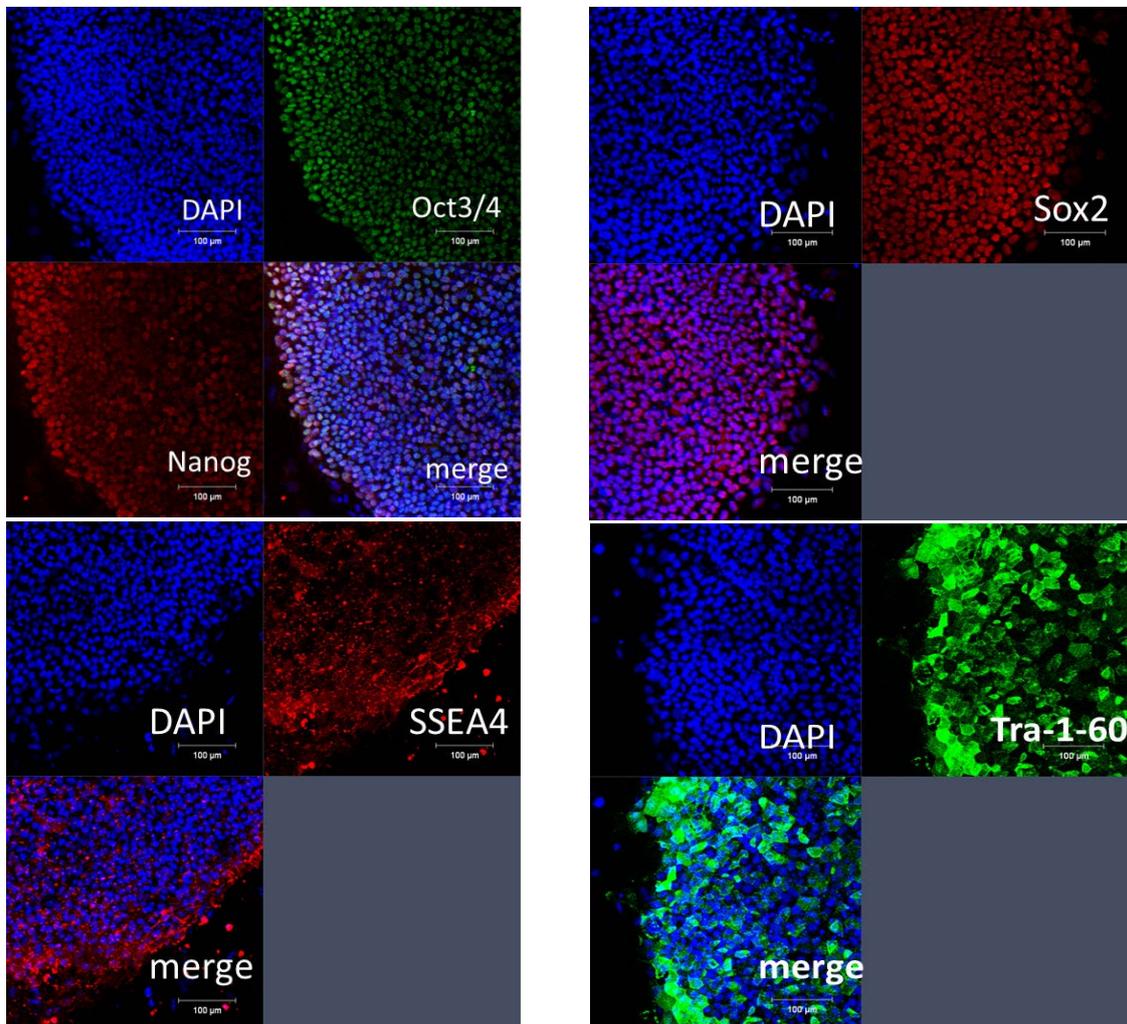


図 9. iPS 細胞の未分化マーカーの染色

UT-iPS1-1 クローンを用い、未分化マーカーの免疫染色を実施した。

スケールバーは 100 μ m。

最も良い心筋分化誘導効率をもたらす Wnt 活性化剤 X の種類と濃度の同定

胚様体法での心筋分化誘導の初期、すなわち胚様体を形成して最初の 2 日間に培地に添加し、最も効率のよい心筋分化をもたらす Wnt 活性化剤(X)の種類を同定を試みた。

まず、4 種類の化合物を 0.1/ 1/ 10 μM で使用し、胚様体が残存する濃度帯を検討した。その結果、分化開始 8 日目の時点で、CHIR99021 はいずれの濃度帯でも胚様体は残存し、濃度依存的に胚様体の数・大きさが増大する傾向が見られた。BIO 10 μM 、Wnt agonist 1 μM 以上、Wnt agonist II 10 μM では化合物の毒性のため胚様体が残存しなかった。Control である DMSO 0.1% の条件でも胚様体は残存したが、3 日目以降に IWP2/ VEGF/ bFGF を添加した場合と、3 日目以降も DMSO 0.1% のみの添加を継続した条件とを比べると前者の方がややその数は少なく、これらの化合物添加による影響が考えられた。これらの結果を表 5(a) にまとめた。また分化 8 日目の胚様体の写真を 図 10 に示した。

続いて各化合物で、より狭い範囲の濃度帯で拍動胚様体出現の有無を検討した。CHIR99021 は 1/ 5/ 10 μM で、BIO は 0.5/ 2.5/ 5 μM で、Wnt agonist は 0.01/ 0.05/ 0.1 μM で、Wnt agonist II 0.1/ 0.5/ 1 μM で検討した。結果、CHIR99021 の 5 μM でのみ拍動胚様体が観察された。これらの結果を表 5(b) にまとめた。このためさらに CHIR99021 5 μM 付近の濃度帯を詳細に検討することとした。

表 5(a). Wnt シグナル活性化剤が胚様体残存に与える影響

化合物名	濃度	胚様体の残存
CHIR99021	0.1 μ M	+
	1 μ M	+
	10 μ M	+
BIO	0.1 μ M	+
	1 μ M	+
	10 μ M	-
Wnt agonist	0.1 μ M	+
	1 μ M	-
	10 μ M	-
Wnt agonist II	0.1 μ M	+
	1 μ M	+
	10 μ M	-
control	DMSO 0.1%	+

UT-iPS1・UT-iPS2 由来の 2 クローンを用い、CHIR99021・BIO・Wnt agonist・Wnt agonist II を表の濃度で使用して心筋分化誘導を行った。(n=2) 分化 8 日目の胚様体の残存を確認した。各 Wnt 活性化剤の投与期間は分化 1-3 日目とし、分化 3 日目以降に使用する Wnt 阻害剤として IWP2 5 μ M を選択した。

胚様体の生存; +…よく残存する、-…残存しないか形が崩れてしまう

表 5(b). Wnt シグナル活性化剤と拍動胚様体の有無

化合物名	濃度	拍動胚様体
CHIR99021	1 μ M	-
	5 μ M	+
	10 μ M	-
BIO	0.5 μ M	-
	2.5 μ M	-
	5 μ M	-
Wnt agonist	0.01 μ M	-
	0.05 μ M	-
	1 μ M	-
Wnt agonist II	0.1 μ M	-
	0.5 μ M	-
	1 μ M	-
control	DMSO 0.1%	-

表 5(a). に引き続き、胚様体の残存が確認される範囲の濃度帯で CHIR99021・BIO・Wnt agonist・Wnt agonist II を投与し、心筋分化誘導を行った。分化 16 日目に拍動胚様体が確認されるかを観察した。

Wnt 活性化剤の投与期間は分化 1-3 日目とし、分化 3 日目以降に使用する Wnt 阻害剤は IWP2 5 μ M に固定した。(Wnt agonist, Wnt agonist II は n=2、他は n=5)

+...拍動胚様体が存在する、 -...拍動胚様体が存在しない

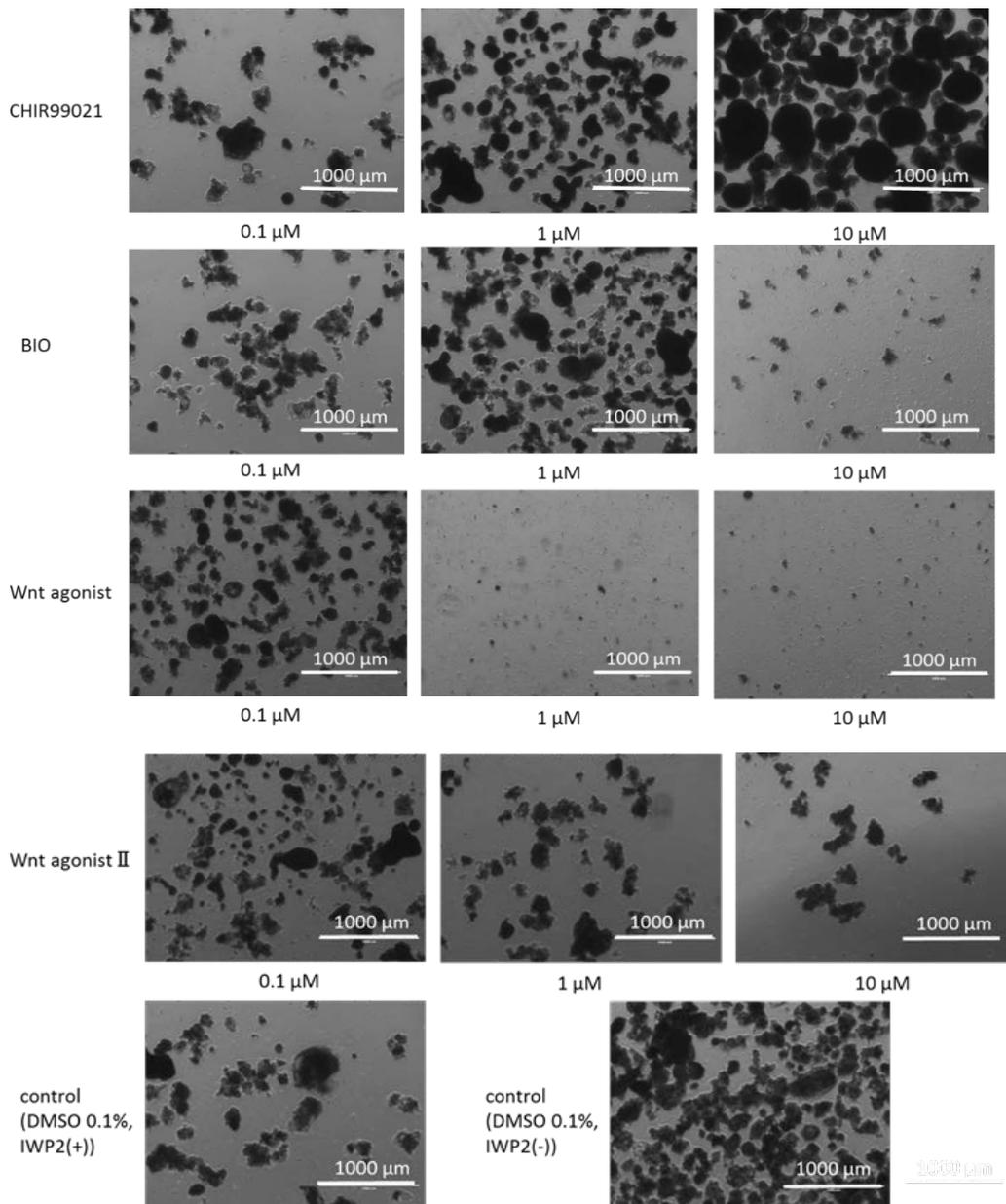


図 10. 分化誘導 8 日目の胚様体の写真

UT-iPS1-1・UT-iPS2-1 の 2 クローンを用い、CHIR99021・BIO・Wnt agonist・Wnt agonist II を使用して心筋分化誘導を行った。各 Wnt 活性化剤の投与期間は分化 1-3 日目とし、分化 3 日目以降に使用する Wnt 阻害剤として IWP2 5 μM を選択した。Control として、1-3 日目に DMSO 0.1% を投与して 3 日目以降は IWP2/ VEGF/ bFGF を含む培地で培養したもの(DMSO 0.1%, IWP2(+))、3 日目以降も DMSO 0.1% のみの投与を継続したもの(DMSO 0.1%, IWP2(-)) の 2 つを設定した。分化 8 日目での胚様体の様子を撮影した (表 5(a)の結果に対応)。(倍率 4 倍) 上記は代表的な UT-iPS1-1 結果の写真である。

Wnt 活性化剤としては CHIR99021 が最もよい心筋分化効率をもたらすと考
えられ、3-6 μM の範囲で至適濃度を検討した。結果、4 μM ないし 5 μM での使
用が有意に効率よく、6 μM 以上で急に効果が低下することが分かった[図
11(a)]。使用したクローンごとの結果では、UT-iPS1-1 クローンでは CHIR99021
の濃度が 3-5 μM での使用が効率よく、UT-iPS2-1 クローンでは CHIR99021 4-5
 μM の濃度での使用がよいことが判明した[図 11(b)]。クローン間差と実験回ご
とのばらつきを考慮すると、心筋分化における CHIR99021 の至適濃度は 4-5
 μM の範囲であると判明した。

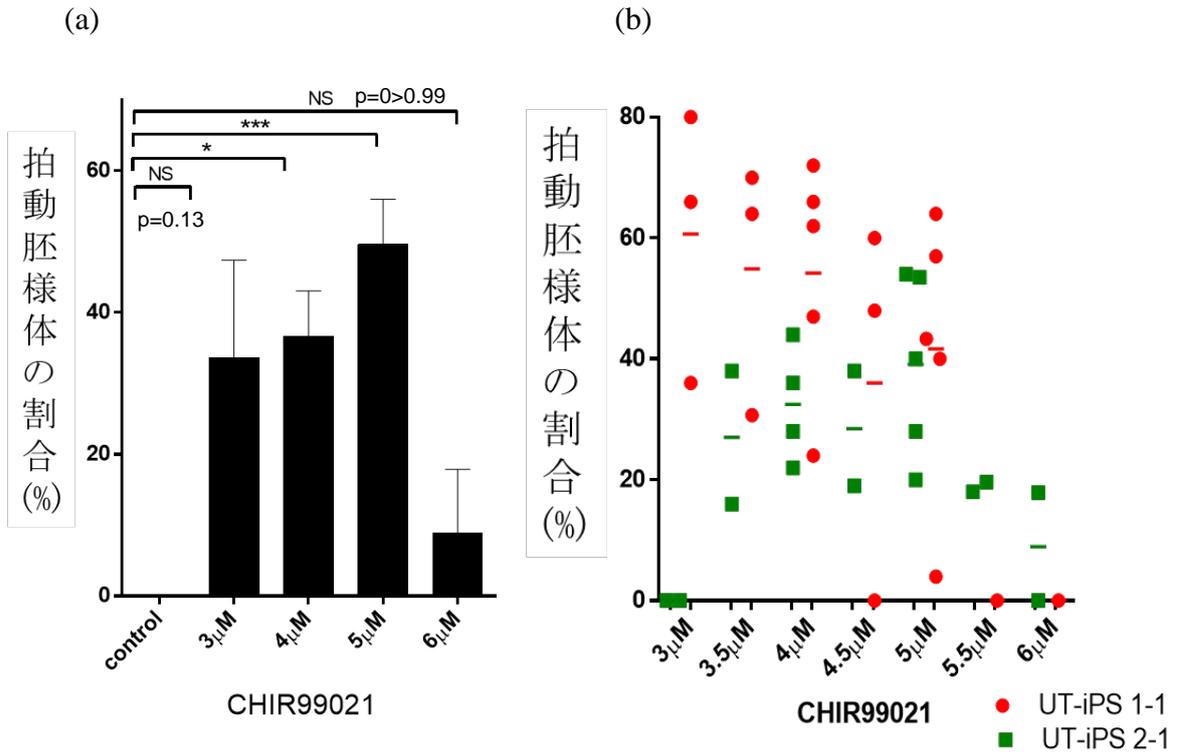


図 11. CHIR99021 の濃度と分化 16 日目の心筋分化効率の関係
 UT-iPS1-1, UT-iPS2-1 の 2 クローンを用いて心筋分化誘導における CHIR99021 の至適濃度を検討した。

(a) CHIR99021 を 3 μ M から 6 μ M の範囲で変化させて分化誘導を行ったときの、CHIR99021 の濃度と分化効率の関係を示した。2 クローンを合わせた結果を表示した。(トータル n=40)

(b) ; CHIR99021 の濃度を 3-6 μ M で 0.5 μ M 刻みで変化させたときの、クローンごとの心筋分化効率を示した。バーは平均値を示す。

複数の Wnt 活性化剤の組み合わせの効果の検討

Wnt 活性化剤を 2 種類併用することで心筋分化効率を上昇させられないか検討した。CHIR99021 を 5 μ M 培地に添加し、図 12. に示すように Wnt 活性化剤を添加し、心筋分化誘導の効率の上昇効果があるか検討した。その結果、Wnt Agonist II を低濃度で添加することでわずかに効率の上昇が見られたが、有意な効率の改善は認められなかった。CHIR99021 と BIO、CHIR99021 と ICG001 の組み合わせは胚様体がほとんど生存しなかった。

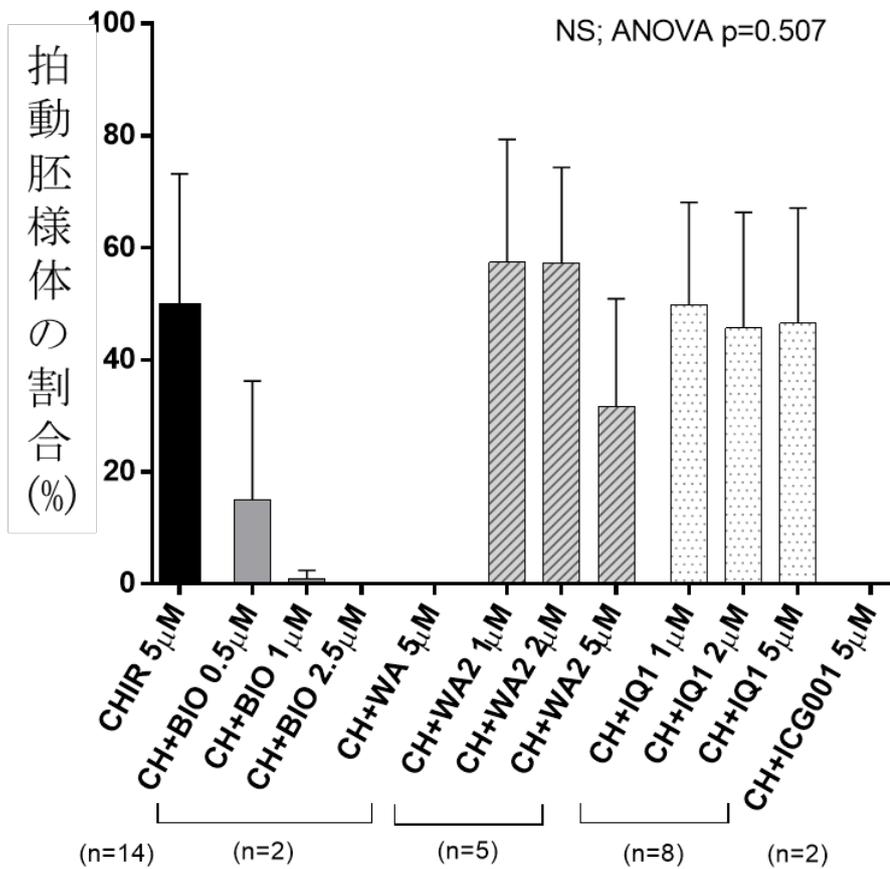


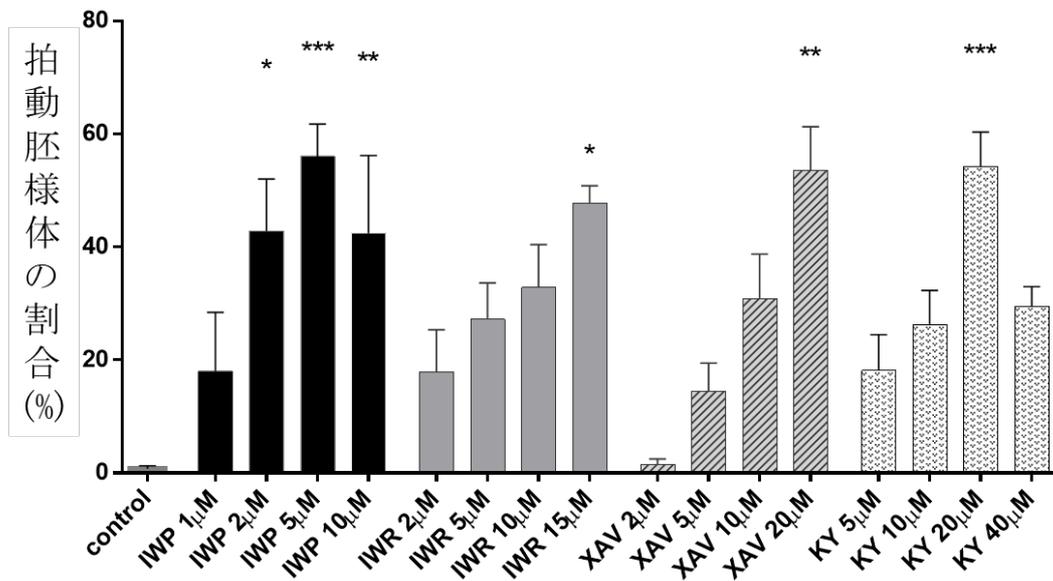
図 12. Wnt 活性化剤の組み合わせと分化 16 日目の分化効率との関係
 心筋分化誘導における Wnt 活性化剤 2 種類の組み合わせの効果を検討した。
 単独で心筋分化誘導効果の高かった CHIR99021 5 μ M(CH)に、異なる Wnt 活性化剤を濃度を変化させて加えて分化誘導を行い、分化効率との関係を示した。
 (WA; Wnt agonist, WA2; Wnt agonist II)

最も良い心筋分化誘導効率をもたらす Wnt 阻害剤 Y の種類と濃度の同定

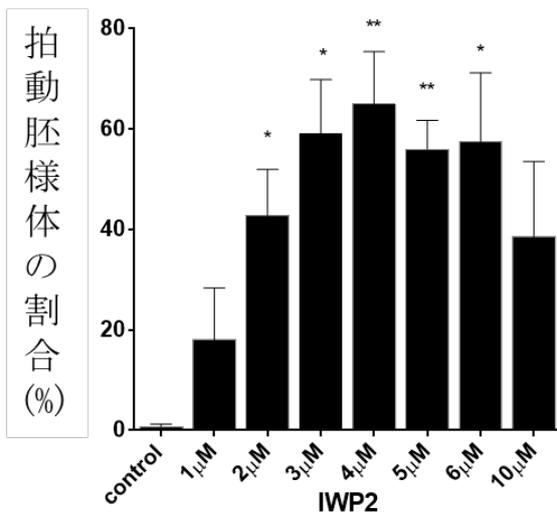
次に Wnt 活性化剤を CHIR99021(5 μM)に固定し、Wnt 阻害剤のうち最も適切なものの種類および濃度を検討した。機序の異なる 4 種類の化合物を検討した結果、どの化合物でも適切な濃度帯で使用すれば 50%以上の拍動する胚様体が得られた。[図 13(a)] IWP2 10 μM 以上、IWR1 15 μM 以上、XAV939 20 μM 以上は細胞死が増加し、KY02111 40 μM 以上は培地に不溶となり析出が見られた。

もっとも効率がよかった IWP2 を用い、5 μM 付近の効果を検討した。IWP2 については 2-6 μM でコントロールと比べて有意に効率よい心筋分化誘導がもたらされ、特に IWP2 3-6 μM の範囲でクローンによるばらつきが小さく望ましい結果が得られることが分かった。[図 13(b), 13(c)]

(a)



(b)



(c)

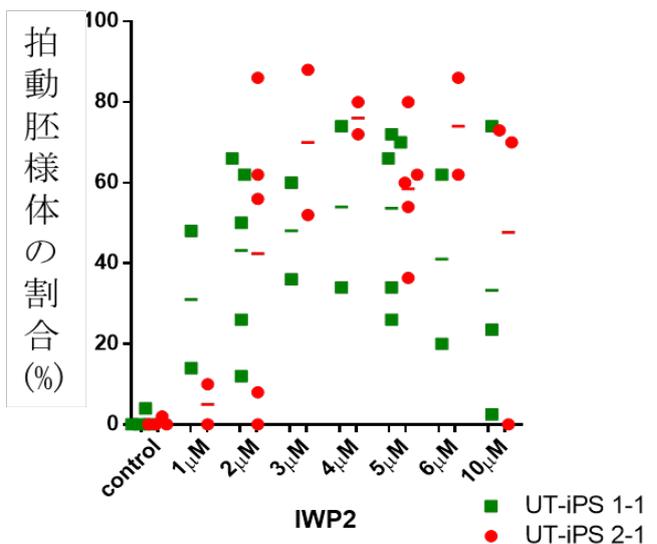


図 13. Wnt 阻害剤の種類と分化 16 日目の分化効率の関連

UT-iPS1-1, UT-iPS2-1 クローンを用いて、心筋分化誘導における Wnt 阻害剤の種類と濃度を変化させたときの、化合物の種類・濃度と 16 日目の分化効率との関係を示した。(IWP; IWP2, IWR; IWR1, XAV; XAV939)

(a)(b) 2 クローン分の結果をまとめて表示した。(n=4-10) 有意差検定はコントロールに対して行った。

(c) クローンごとの結果を示した。(バーは平均値を表す)

複数の Wnt 阻害剤の組み合わせの効果の検討

最も安定的によい心筋分化効率をもたらす IWP2 5 μM に、他の Wnt 阻害剤を加えることでさらなる効率の改善が見込めるか検討した。図 14.に示すように、前段で検討した 4 種類のうち 2 種類ずつの組み合わせ 6 通りを試したが、IWP2 5 μM 単独投与を有意に上回る条件は認められなかった。

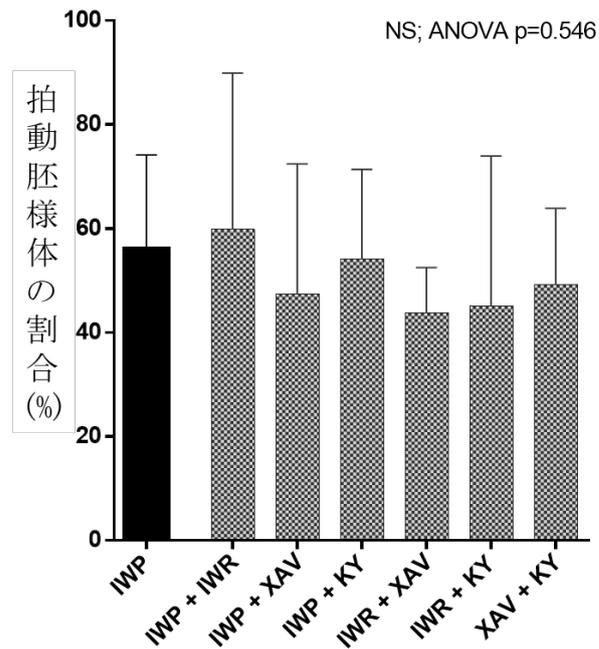


図 14. Wnt 阻害剤の組み合わせと分化 16 日目の心筋分化効率の比較
 心筋分化誘導における Wnt 阻害剤を 2 種類組み合わせたときの、化合物の組み合わせと 16 日目の分化効率の関係を示した。(IWP2 単独群; n=10, その他の群の n=6) Wnt 阻害剤の容量は以下の通りである。

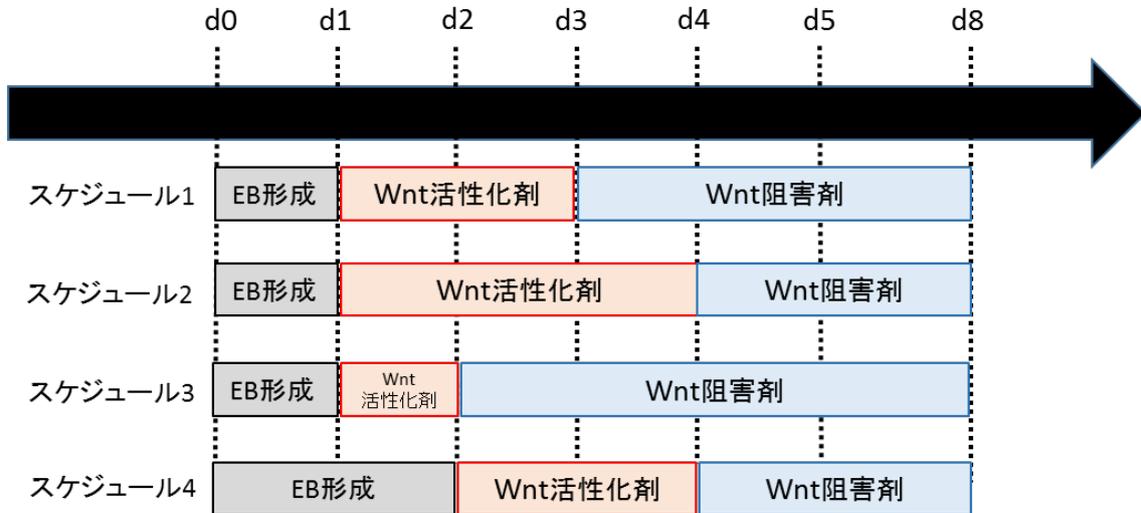
IWP; IWP2 5 μ M, IWR; IWR1 5 μ M,
 XAV; XAV939 10 μ M, KY; KY02111 10 μ M

最も良い心筋分化誘導効率をもたらす Wnt シグナルの活性化/抑制の切り替えのタイミングの同定

我々のプロトコルで、Wnt 活性化剤と阻害剤の切り替えのタイミング、すなわち培地交換のタイミングを変化させることで効率がどう変化するか検討した。UT-iPS1-1 クローンを用い、CHIR99021 を 5 μ M、IWP2 を 5 μ M に固定し、シグナルの切り替えを図 15(a)のスケジュールに従って変化させて分化誘導を行い、最終的な分化効率を比較した。

その結果、Wnt 活性化剤の使用時間と分化効率に関連が見られた[図 15(b)]。1-3 日目の 48 時間に CHIR99021 を使用するプロトコルが最も好ましく、次に 2-4 日目の 48 時間の使用が好ましい結果であった。1-4 日目の 72 時間の使用でも心筋分化は得られたが、効率はおよそ半分以下に低下し、また分化 6 日目時点の評価で胚様体よりがより大きくなる傾向が見られた。CHIR99021 を 1-2 日目の 24 時間のみ使用した場合は図に示すように胚様体が崩れ、分化 16 日目の評価まで細胞が残らず拍動も得られなかった[図 16]。以上より CHIR99021 の使用期間が長い方が胚様体の生存と成長に関しては好ましいが、最終的な心筋分化効率にはさらに狭い至適範囲が存在し、48 時間の使用が最も効率がよいことが示唆された。

(a)



(b)

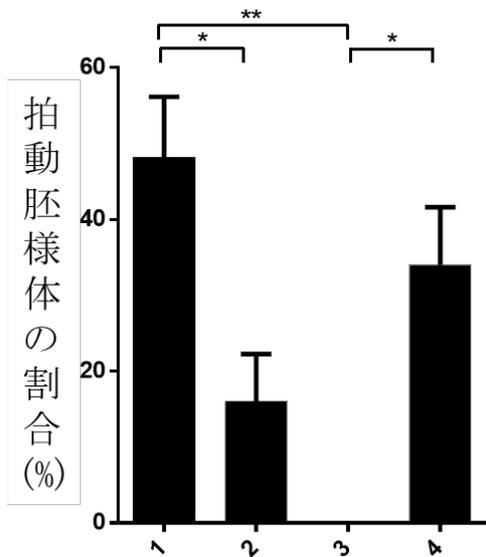


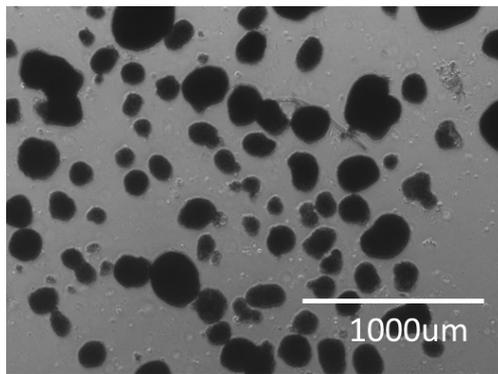
図 15. Wnt 活性化剤/阻害剤の切り替えのタイミングと心筋分化効率の関係

胚様体浮遊培養開始日を 0 日目とし、
①胚様体形成用培地から Wnt 活性化剤入り培地に切り替える培地交換のタイミング、
②Wnt 活性化剤入り培地から Wnt 阻害剤に切り替える培地交換のタイミングを変化させて分化誘導を行った。

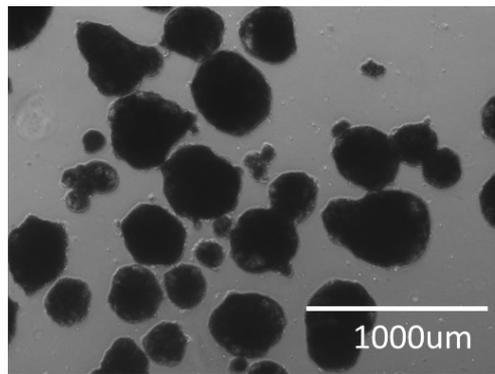
(a)検討した 4 通りのスケジュールを示す。

(b)培地交換スケジュールと分化 16 日目における拍動胚様体の割合の関係を示す。(UT-iPS1-1、n=10)

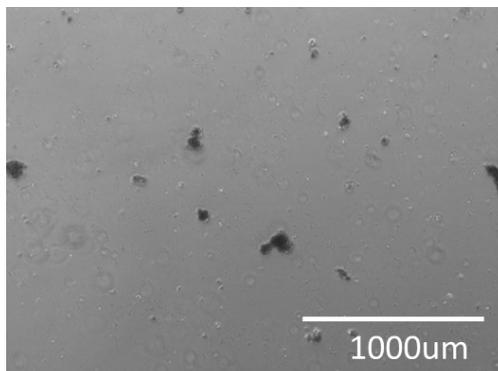
(c)



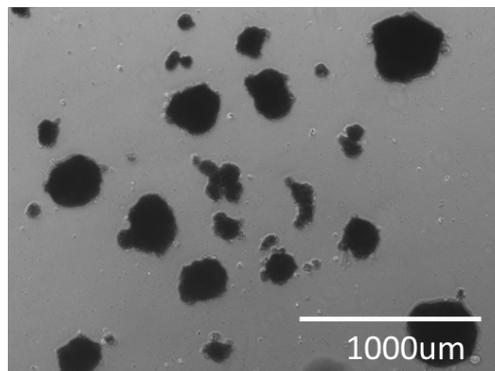
スケジュール1



スケジュール2



スケジュール3



スケジュール4

図 15(c).

心筋分化開始後の培地交換日を図 15(a)のスケジュールに従って変化させたときの、分化6日目の胚様体の様子を撮影した。(倍率4倍)

心筋分化誘導各段階における遺伝子発現の解析

以上の結果から CHIR99021 の濃度と投与期間が最終的な分化効率に大きな影響を与えていることが判明し、心筋分化効率は Wnt シグナルの切り替えのタイミングである分化 3-5 日目付近までにある程度決定付けられていると推測された。そのメカニズムを検討し、最終的な心筋分化効率を予見する分化早期段階のマーカー遺伝子を同定するため、以下の検討を行った。

①CHIR99021 濃度の違いによる遺伝子発現の変化

実験概略を図 16(a)に示す。UT-iPS3-1 クローンを用い、CHIR99021 の濃度を 1/4/10 μM と変化させ、分化 3 日目に Wnt 活性化剤→阻害剤へと培地交換するスケジュールで心筋分化誘導を行った。そして分化 3、6、16 日目で胚様体を回収し、RNA を抽出して各胚葉の分化マーカー遺伝子の発現の変化を解析した。16 日目での拍動する胚様体の割合の結果と同様に、CHIR99021 4 μM のサンプルのみ、分化 16 日目に心筋細胞マーカー遺伝子である *TNNT2*・*MYH6* の発現を認めた。[図 16(b)]

分化 3、6 日目の各胚葉マーカーの遺伝子発現の解析で以下のことが判明した。

(i) Wnt シグナルの標的遺伝子である *Axin2*、*Lef1* は、3 日目の段階で濃度依存的に発現上昇することから、Wnt シグナルの活性化は CHIR99021 の濃度依存的

に生じているが、最終的な分化効率と比較すること、Wnt シグナルのより強い活性化がより効率的な心筋分化をもたらす訳ではないことが分かった。[図

16(c)]

(ii) 未分化細胞のマーカである *Oct3/4*, *Nanog*, *Sox2* の発現は CHIR99021 の濃度が高いほど低下しており、未分化状態からの離脱が進むと考えられた。[図

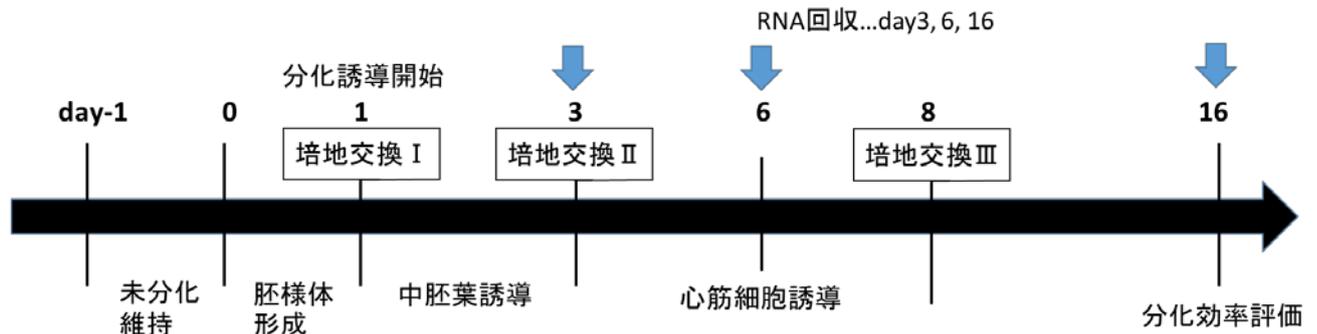
16(d)]

(iii) 中胚葉マーカである *T*, 心臓中胚葉マーカである *Mesp1* の発現は分化3日目に、CHIR99021 濃度依存的に強く誘導された。CHIR99021 1 μM では *T*・*Mesp1* ともに誘導が乏しく、中胚葉誘導が不十分なために最終的な分化誘導が起きないと考えられた。しかし 10 μM の条件では分化3日目の *T*・*Mesp1* の発現は高いにも関わらず最終的な分化効率は乏しく、*T/Mesp1* の発現は心筋分化の十分条件ではないと考えられた。分化6日目の心臓前駆細胞マーカ *Nkx2.5* の発現も最終的な心筋分化効率と相関しなかった。[図 16(d)]

(iii) CHIR99021 10 μM の遺伝子発現を見ると、6日目の段階で *Nestin* や *Pdx1* の発現上昇が見られ、高濃度の CHIR99021 により内胚葉や外胚葉などの中胚葉以外の系統への分化が進んでしまうことが示唆された。[図 16(e)]

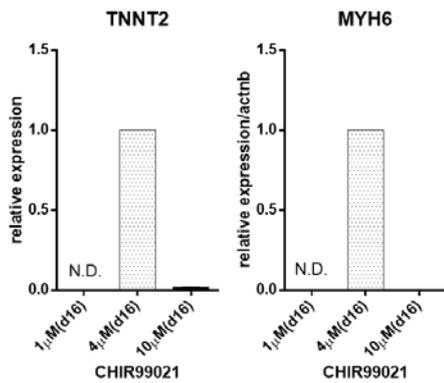
(iv) 最終的に最も効率よく分化する条件である CHIR99021 4 μ M の遺伝子発現をみると、他の条件と異なり分化 3 日目の段階で *Sox17*, *FOXA2* といった内胚葉マーカー遺伝子の発現上昇が見られることが判明した。[図 16(e)]

(a)

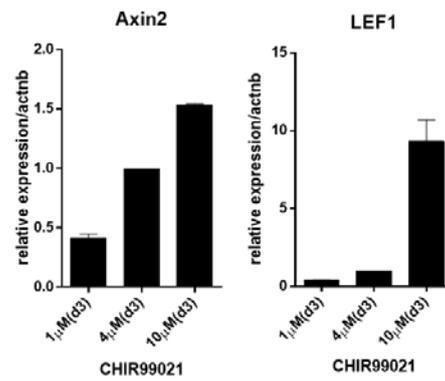


	胚樣體形成	培地交換 I	培地交換 II	培地交換 III
基礎培地	Repro FF2	Modified Stempro	Modified Stempro	Modified Stempro
添加化合物	bFGF 10ng/mL Y27632 5 μ M	CHIR99021 1, 4, 10 μ M	IWP2 5 μ M VEGF 10ng/mL	VEGF 5ng/mL bFGF 10ng/mL

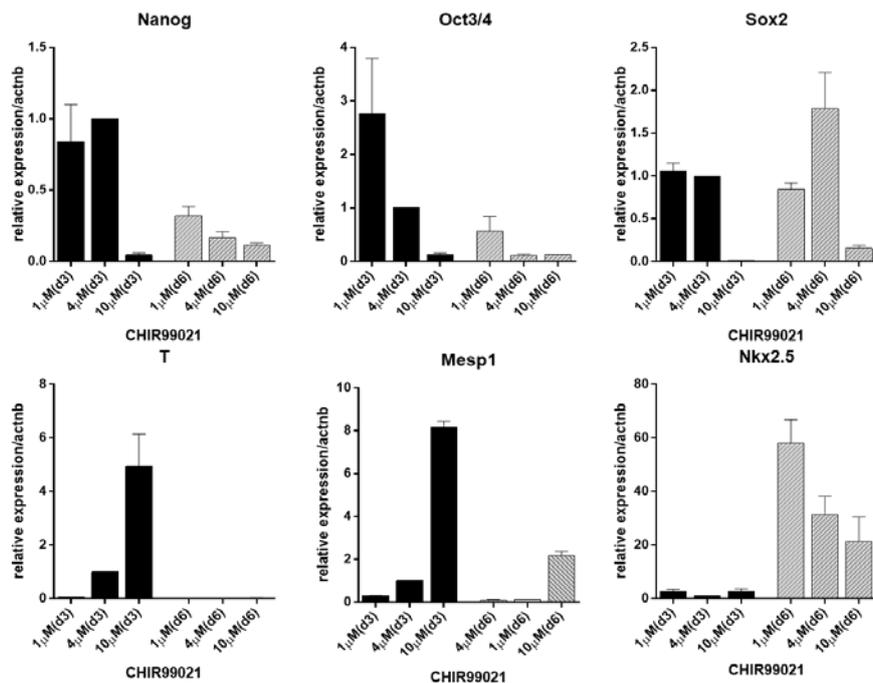
(b)



(c)



(d)



(e)

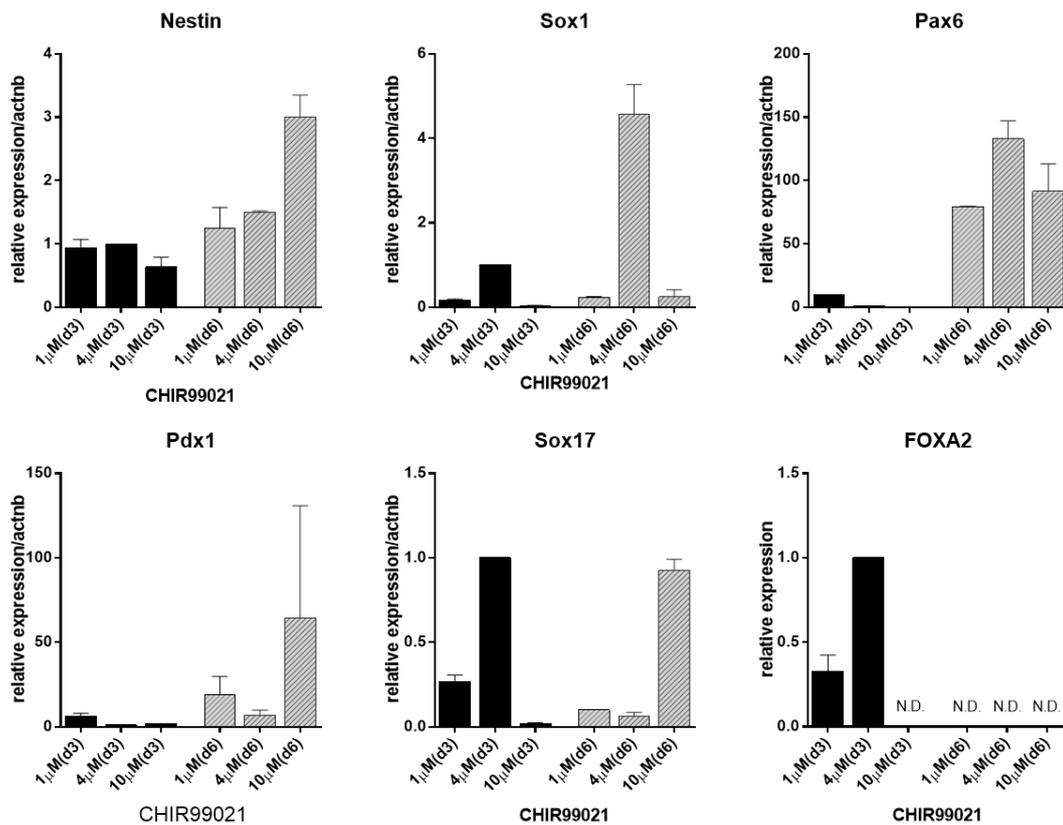


図 16. CHIR99021 の濃度と心筋分化各段階での遺伝子発現

分化誘導における CHIR99021 濃度を 1/4/10 μM と振って心筋分化誘導を行い、分化 3、6、16 日目の胚様体から RNA を回収し、定量的 PCR により各胚葉マーカーや心筋前駆細胞・心筋細胞マーカー遺伝子の発現を解析した。UT-iPS3-1 を使用した。(n=3)

(a) 実験内容の概略図

(b) 分化 16 日目の心筋細胞マーカー遺伝子の発現

(c) 分化 3 日目の Wnt 標的遺伝子の発現

(d) 分化 3,6 日目の未分化マーカー遺伝子、中胚葉・心臓前駆細胞マーカー遺伝子の発現

(e) 分化 3,6 日目の内胚葉・外胚葉マーカー遺伝子

N.D.=データ検出されず

②CHIR99021 の投与期間の違いによる遺伝子発現の変化

Wnt シグナル活性化の期間が分化に与える影響を検討するため、胚様体を Wnt 活性化剤 (CHIR99021 4 μ M) を含む培地で培養して 2/3/4/5 日目に回収し、遺伝子発現を比較した。[図 17(a)] また、Wnt シグナル活性化⇒抑制の切り替えを分化 2/3/4/5 日目に行い、分化 16 日目の胚様体を回収し遺伝子発現を解析した。この解析で以下のことが判明した。

(i) 分化 16 日目での *TNNT2*・*MYH6* の発現はシグナルを 3 日目に切り替えた時が最も高く、4 日目切り替えではその半分程度であり、2 日目・5 日目の切り替えではほとんど発現しなかった。この結果は図 15 に示した培地交換のタイミングを検討した実験の結果とよく一致し、3 日目に Wnt シグナルを活性化から抑制に切り替えるプロトコルの優位性が遺伝子発現からも示唆された。[図 17(b)]

(ii) 分化 2-5 日目の遺伝子発現の解析では、*T*, *Mesp1* が 3 日目にピークを示し、その後は速やかに発現が消失していた。この結果からも中胚葉誘導後である 3 日目以降に Wnt 阻害剤入り培地に切り替えることが必要であると考えられた。[図 17(c)]

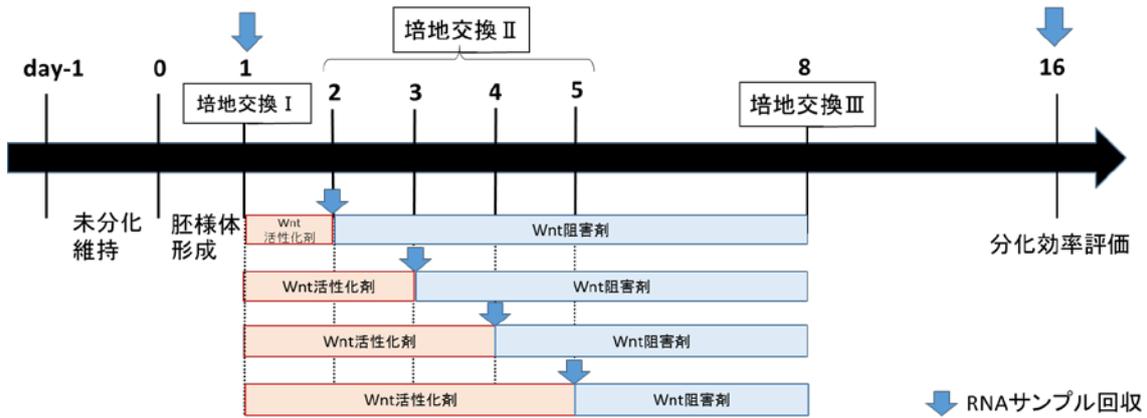
(iii) CHIR99021 投与がより長期間になると、*Nestin/Pax6/Sox1* などの発現が上昇し、外胚葉への分化が進んでしまうことが示唆された。[図 17(d)]

(iv) 内胚葉マーカーである *Sox17* 遺伝子の発現は分化 3 日目に上昇し減弱する傾

向が見られた。培地交換日切り替えのタイミングを変化させたとき、その交換時における *Sox17* の発現レベルと、最終的な分化効率とがよく相関していた。[図 17(d)]

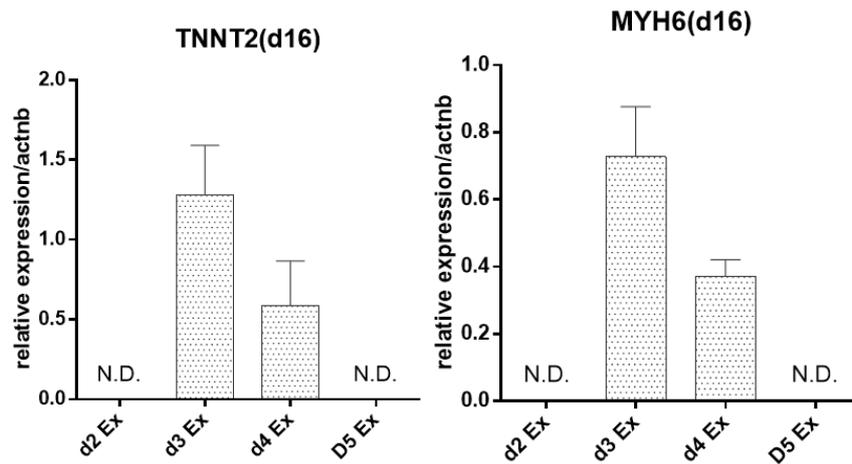
CHIR99021 の濃度を変化させたときの遺伝子発現変化と、投与期間を変化させたときの遺伝子発現変化、さらに最終的な分化効率を総合して考えると、心筋分化誘導の際「Wnt シグナルを活性化から抑制へスイッチするタイミングの *Sox17* の発現量」が最終的な分化効率のマーカーとなる可能性が示唆された。

(a)

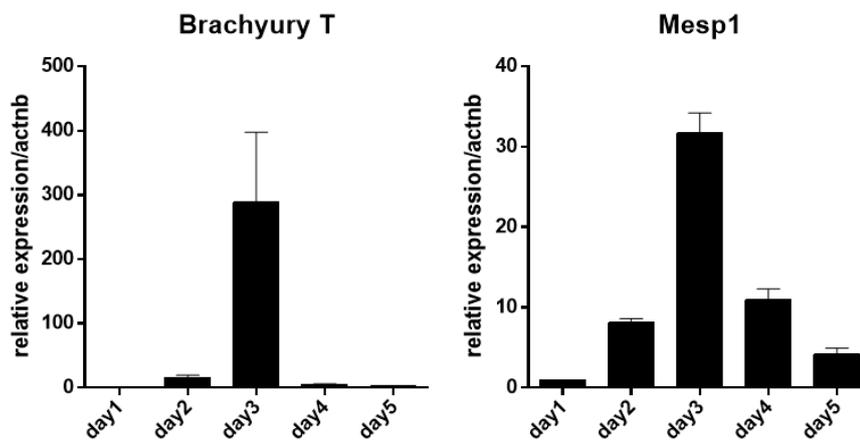


	胚様体形成	培地交換 I	培地交換 II	培地交換 III
基礎培地	Repro FF2	Modified StemPro	Modified StemPro	Modified StemPro
添加化合物	Y27632 5 μ M	CHIR99021 4 μ M	IWP2 5 μ M VEGF 10ng/mL	VEGF 10ng/mL

(b)



(c)



(d)

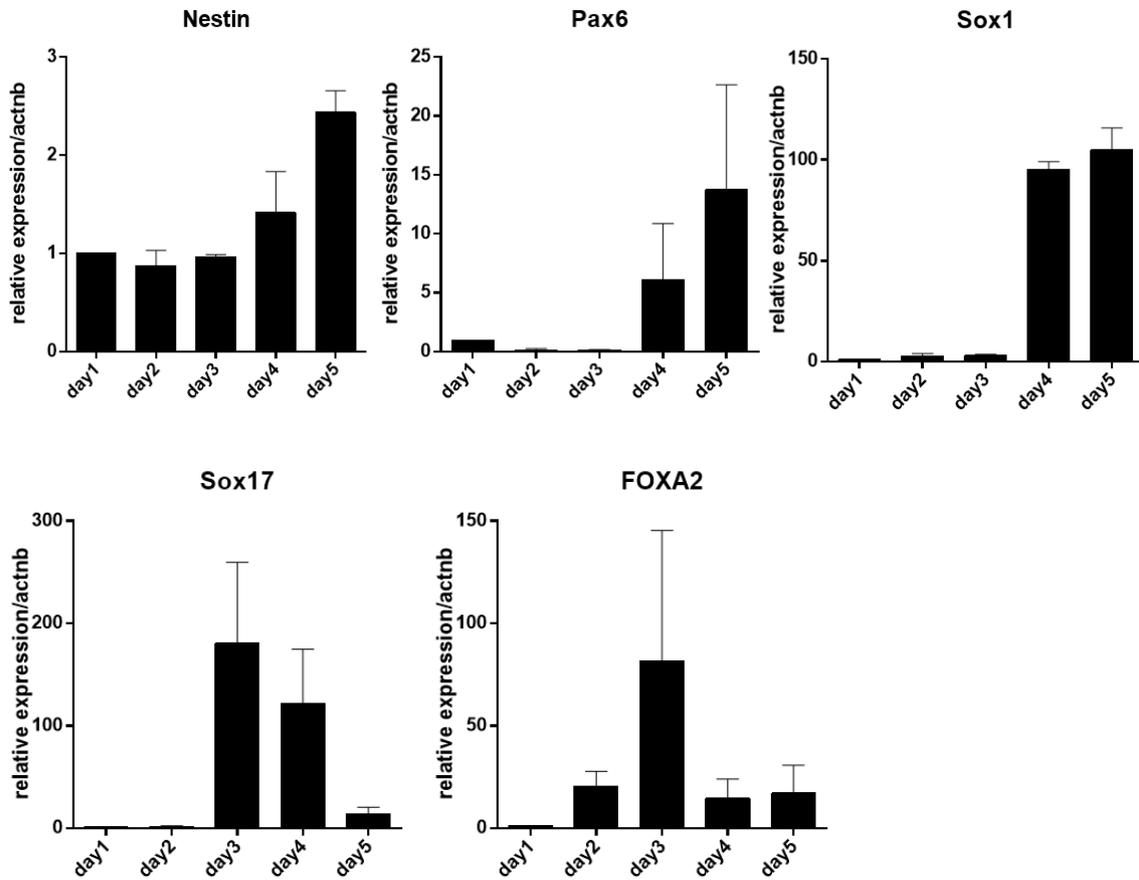


図 17. Wnt シグナルの切り替えのタイミングと遺伝子発現

Wnt シグナル活性化⇒抑制の切り替えのタイミングの違いと最終的な心筋分化効率の関連を解析するため、CHIR99021 (4 μ M)入りの培地で胚様体を培養開始し、分化 2/3/4/5 日目 それぞれのタイミングで IWP2 (5 μ M)入りの培地に交換して分化誘導を行った。また胚様体形成時(day1)・それぞれの培地交換のタイミング(day2/3/4/5)・分化 16 日目(day16)に RNA サンプルを回収し遺伝子の発現を解析した。(n=3) UT-iPS3-1 を使用した。

(a) 実験内容の概略図

(b) 分化 16 日目の心筋細胞マーカー遺伝子の発現

(d2 Ex; 分化 2 日目にシグナルを切り替えたサンプルを示す)

(c) 分化 1-5 日目の中胚葉マーカー遺伝子の発現

(d) 分化 1-5 日目の内胚葉・外胚葉マーカー遺伝子の発現

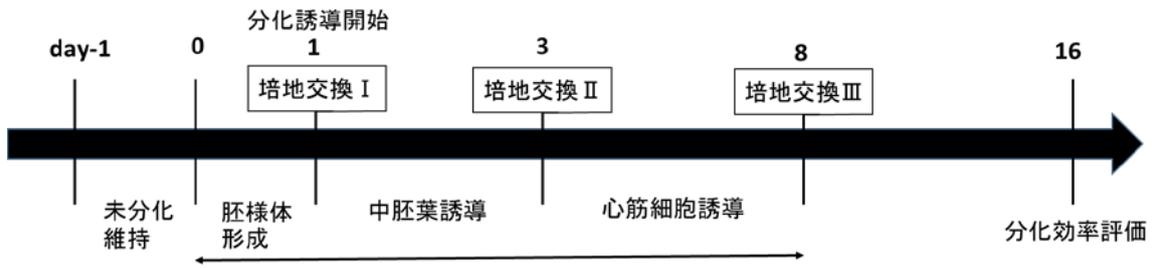
N.D.=データ検出されず

サイトカインを用いない心筋分化誘導方法の開発

完全にサイトカインを用いないプロトコルを開発するため、CHIR99021 と IWP2 のみを用い、VEGF・bFGF を用いずに心筋分化誘導を行ったところ、それでも心筋分化誘導は達成されたが、効率が 2 分の 1 程度に低下した。(有意差は認めず) [図 18(a)(b)]

分化効率を維持するために、VEGF, bFGF の代わりに心筋分化効率を上昇させる化合物の検討を行った。既報から中胚葉誘導後に心筋分化を促進する化合物として SB431542 (5 μ M)、E2(100 nM)を見出し、これらを併用して心筋分化誘導を行ったところ、サイトカインを使用した時とほぼ同等の心筋分化効率を得られた。[図 18(a)(b)]

(a)



	胚様体形成	培地交換 I	培地交換 II	培地交換 III
基礎培地	Repro FF2	Modified StemPro	Modified StemPro	Modified StemPro
添加化合物セット①	Y27632 5 μ M	CHIR 4 μ M	IWP2 5 μ M VEGF 10ng/mL	VEGF 10ng/mL bFGF 5ng/mL
添加化合物セット②	Y27632 5 μ M	CHIR 4 μ M	IWP2 5 μ M	なし
添加化合物セット③	Y27632 5 μ M	CHIR 4 μ M	IWP2 5 μ M SB431542 5 μ M(d6まで) E2 100nM	E2 100nM

(b)

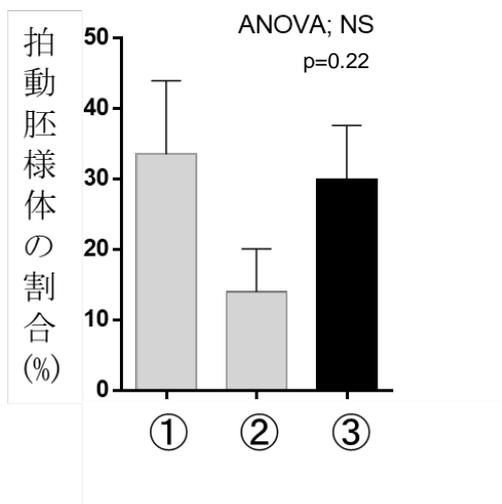


図 18. VEGF, bFGF の低分子化合物による置換と心筋分化効率

VEGF, bFGF を含むプロトコル①と、サイトカインを含まないプロトコル②③の心筋分化効率を比較した。

(UT-iPS 2-2 クローンを使用)

(a) 比較した分化誘導プロトコルの概略
(b) (a)に記した分化誘導プロトコルと分化 16 日目の分化効率の関連 (n=6)

最終的に使用する添加物をすべて低分子化合物に置換したプロトコルを作成した。[図 19] サイトカインの使用を回避することにより、Keller 法[図 4]と比較して必要な添加剤のコストが約 25 分の 1 までに抑えられた。(培地 1L スケールで心筋分化誘導を行ったときの試算で、1,376,250 円から 57,150 円までの削減に成功した。)

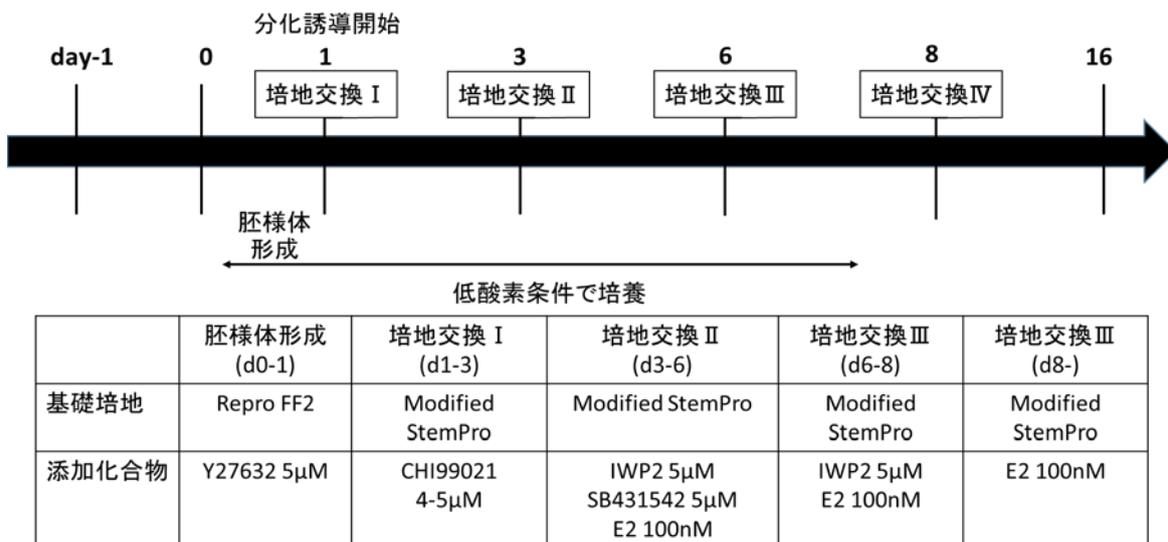


図 19. 今回開発した iPS 細胞からの心筋分化誘導方法

心筋細胞の純化方法を併用した際の TNNT2 陽性細胞の割合

今回開発したプロトコルで分化誘導を行った後、乳酸含有・グルコース不含培地で培養することで心筋細胞の純化をおこなった。その後に胚様体を酵素で単細胞にまで解離し、心筋細胞マーカーである TNNT2 を染色してその陽性率をフローサイトメトリーで解析した。

その結果、分化 31 日目の解析で（精製終了 3 日後）、異なる 2 つのクローンで、 $96.9 \pm 0.72\%$ ・ $89.7\% \pm 1.56\%$ と高純度の心筋細胞が得られていた(n=3)。[図 20]

ただし、乳酸処理後日数がたつと非心筋細胞の増殖により、TNNT2 陽性細胞率は低下した。分化 34 日目(精製 6 日後)の解析では約 63%、41 日目(精製 13 日後)の解析では 16%にまで低下していた。

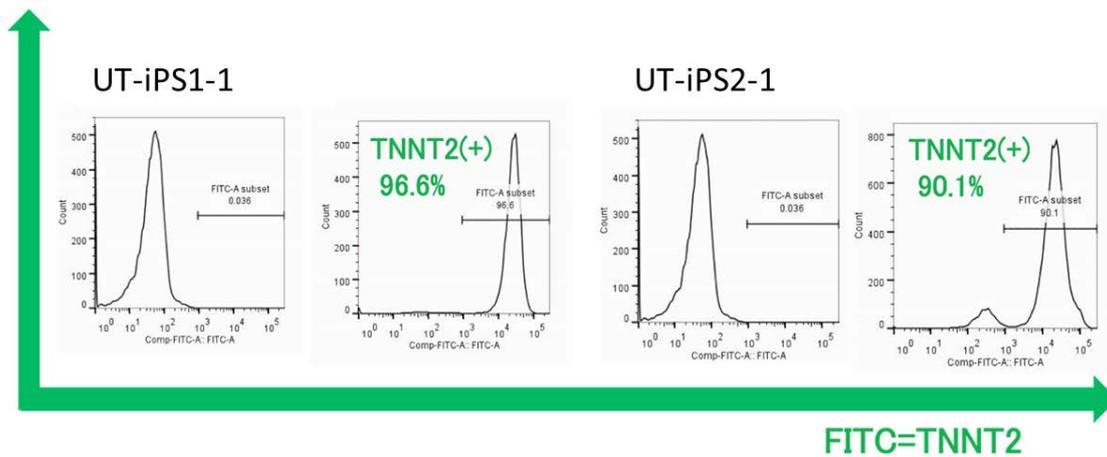
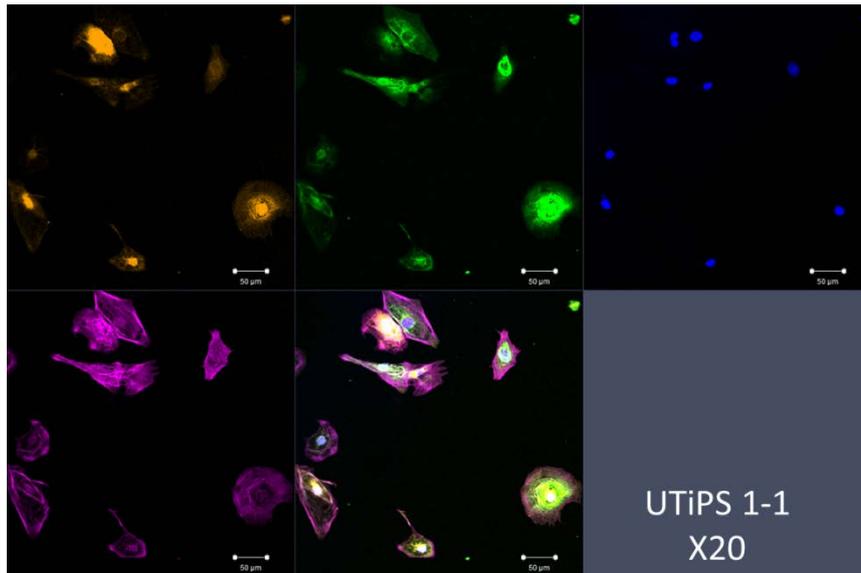


図 20. 分化誘導後精製した心筋細胞の解析

分化 20 日目まで開発したプロトコルで分化誘導を行い、分化 28 日目まで心筋細胞を乳酸含有・グルコース不含培地で培養することで精製した後、TNNT2 陽性細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した。上は分化 31 日目での代表的な実験結果を示す。

得られた心筋細胞のアイソタイプの検討

心筋細胞は遺伝子発現や電気生理的特徴から心室筋タイプ・心房筋タイプ・刺激伝導系タイプの3つのアイソタイプに分けることができる。幹細胞から分化誘導した心筋細胞ではこれらが入り混じって誘導されてくることが知られている。MLC2v(MYL2)は心室筋細胞特異的なミオシン軽鎖タンパクであり、MLC2a(MYL7)では心房筋特異的なミオシン軽鎖タンパクで、成体ではそれぞれ心室筋細胞・心房筋細胞の特異的なマーカーとされているが、発生初期の段階ではMLC2aは全心筋細胞に陽性で、徐々に心房筋へ限局していくとされている³⁵。我々の誘導方法ではどのタイプが優位なのか検定するため、iPS細胞由来心筋細胞を免疫染色しカウントした。結果、我々の誘導方法で得られた細胞はクローンによる差はあるが、70%前後でMLC2vが単独陽性であり、心室筋が優位に誘導されることが判明した。[図 21, 表 6]



MLC2a MLC2v DAPI TNNT2

(図 20) 免疫染色による iPS 細胞由来心筋細胞の心房・心室筋割合の測定
 iPS 細胞由来心筋細胞の免疫染色を行い、MLC2a 陽性細胞・MLC2v 陽性細胞・
 MLC2a/2v 両陽性細胞の割合を検討した。(分化 30-35 日、細胞数>50)
 上記は代表的な 1 視野の写真を示す (UT-iPS 1-1)。

表 6. 分化誘導した心筋細胞の MLC2a・MLC2v 陽性割合

	UTiPS1-1	UTiPS1-2	UTiPS1-3
MLC2v(+)	82.5%	42.9%	93.4%
MLC2a(+)	5%	38.7%	0%
MLC2a(+)/2v(+)	12.5%	18.4%	6.6%

同一個体由来の複数のクローンで染色を行い、それぞれの陽性の割合を測定した。

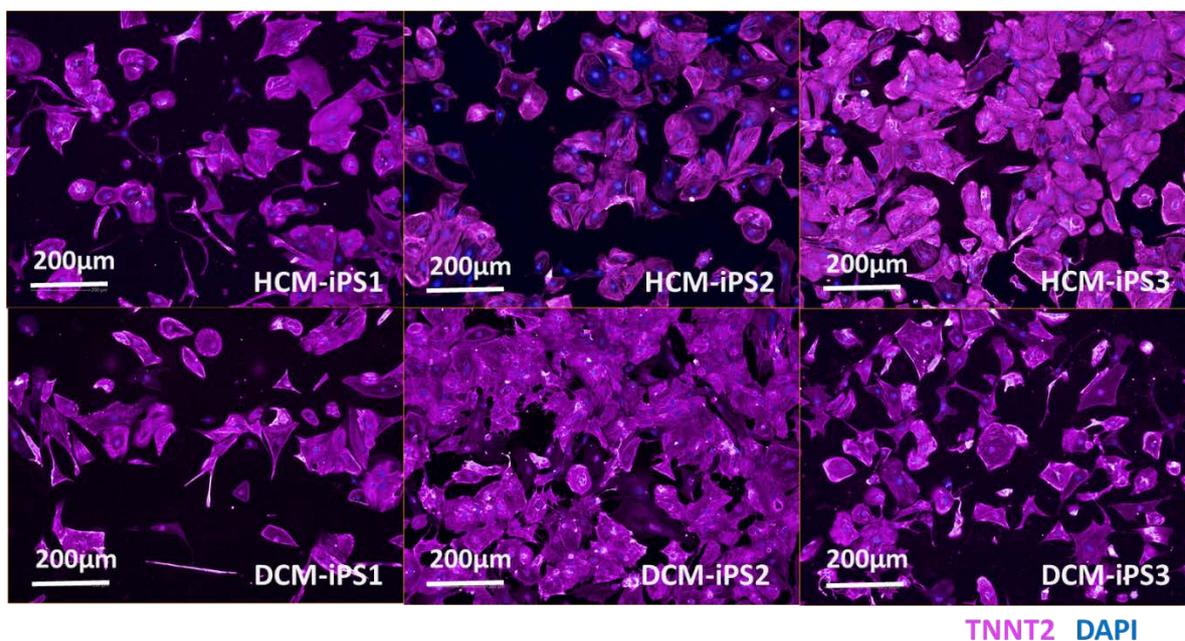
TNNT2 陽性細胞のうち、MLC2v 単独陽性、MLC2a 単独陽性、MLC2a/MLC2v 両陽性細胞 それぞれの割合を計測し示した。

開発した心筋分化誘導方法の再現性と疾患 iPS 細胞クローンへの応用

開発した心筋分化誘導プロトコルの再現性を確認するため、DCM, HCM 患者から樹立した iPS 細胞を用いて同様に心筋分化を行った。患者の背景につき表 7 に示す。分化誘導で得た細胞の TNNT2 の免疫染色を行い、いずれの個体由来のクローンでも同様に TNNT2 陽性の細胞が得られていることを確認した。(図 21)

表 7. 作成した心筋症患者由来 iPS 細胞と患者情報

クローン名	年齢 (iPS 細胞作成時)	性別
HCM-iPS1	36	男性
HCM-iPS2	10	男性
HCM-iPS3	63	男性
DCM-iPS1	44	女性
DCM-iPS2	14	男性
DCM-iPS3	11	女性



(図 21) 肥大型心筋症および拡張型心筋症患者から iPS 細胞を樹立し、開発したプロトコルで心筋分化誘導を行った。得られた心筋細胞を TNNT2 で免疫染色し、陽性となること確認した。(分化日齢 30-35 日) 上記は各クローンの代表的な 1 視野の写真である。倍率 10 倍)

⑥考察

今回の研究で、Wnt シグナルを活性化する化合物と抑制する化合物を組み合わせ、その種類と濃度を最適化することでヒト iPS 細胞から効率的に再現性よく心筋分化誘導を行う方法を開発した。健常者由来の iPS 細胞 3 クローン、HCM 患者由来の iPS 細胞 3 クローン、DCM 患者由来の iPS 細胞 3 クローンから同様に心筋細胞を誘導することができ、当分化誘導法が由来となる個体や iPS 細胞クローンを問わない再現性の高い方法であることが確認された。分化誘導開始後 16 日目に拍動する胚様体の割合を数えることで分化効率を検討したところ約 60%前後の効率を得られ、これは既報¹⁸とほぼ同様かやや上であった。サイトカインの組み合わせを低分子化合物の組み合わせに置換することができたため、我々の方法は再現性と経済性の点で有利であると考えられる。

今回の方法では、心筋分化誘導開始の方法として知られる 2 種類の代表的な方法（胚様体法と単層法）のうち胚様体法を採用した。胚様体法では、分化に用いる低接着フラスコのスケールを大きくし、胚様体あたりの培地を比例して増やすことで、細胞にとっての環境を大きく変化させることなく実験のスケールアップをすることが可能である。今回は主に 25cm² フラスコで分化開始したが、175 cm² など大容量の低接着フラスコを用いることで分化スケールを拡大できる。現在 10 cm dish (60 cm²) 1 枚から回収できる iPS 細胞はおよそ 5-10×10⁶

個程度であり、 10^8 スケールまで拡大することも可能である。一方で単層法では分化開始のタイミングで細胞を均一に高密度で維持することが重要であるため、6well plate や 12well plate での分化開始が望ましく、 10^5 スケールのオーダーでの分化誘導が限界である。今後 iPS 細胞由来心筋を臨床研究に応用することを想定した場合、ヒト心臓を構成する心筋細胞の数は 10^9 程度であるとされており、再生医療でも同等のスケールの心筋細胞が必要とされると考えられる。また iPS 細胞由来心筋細胞に複数の化合物を作用させることで新規治療薬のシーズのスクリーニングを試みる創薬研究でも、スクリーニングに使用される化合物は数万以上に及ぶことが見込まれる。これらのスケール拡大の要求に応えるために、低分子化合物のみを用いて胚様体法による分化誘導方法を開発した意義は大きいと考えられる。

一方で胚様体法には、分化誘導の最初期の胚様体の大きさが不均一になりやすいという問題、一定の大きさ以上の胚様体内部には培地中の成分や添加薬剤が拡散・作用しない可能性があるという問題がある。

今回の方法では、胚様体形成時フィーダー細胞から剥離した iPS 細胞コロニーを手動的に砕いて細胞塊を作り浮遊させるが、その際にできる細胞塊の大きさ (=胚様体の大きさ) のばらつきが大きいため内部の細胞環境が不均一とな

り、心筋分化効率のばらつきも大きくなる可能性がある。また、酸素やサイトカイン、低分子化合物などの培地中の物質の胚様体内部への拡散はその大きさに依存しており、数 100 μm の胚様体の内部では意図したシグナル変化が達成されていない可能性がある。

Mohr らは加工された microwell plate を用いることでヒト ES 細胞から均一な特定の大きさの胚様体を形成し、血清入り培地で培養することで心筋分化誘導を行い、胚様体の大きさと分化効率の関係を検討した。その結果、胚様体の大きさが 300 μm のときに拍動する胚様体の割合が最も多く、MLC2a 陽性細胞数で判定する心筋細胞の割合は 100 μm でもっとも高かった³⁶。このように胚様体の大きさは分化効率を決定する一因子の可能性があり、この方法で用いられている特殊な microwell plate を用いるなどして均一な胚様体を得る工夫を加える余地がある。

胚様体への薬剤の作用をより確実にするため、最初に胚様体を形成する時点で細胞塊をストレイナーに通し、一定の大きさ以下の胚様体のみを分化誘導に使用することでより分化効率を安定させることができるかもしれない。また最近では、胚様体を形成する際、幹細胞をシングルセルにまで解離させ、回転羽根付きフラスコやバイオリアクターで浮遊培養する方法も報告されており、この方法は胚様体の不均一性やサイズの問題を克服しうると考えられる^{37,38}。

序文に記した通り Activin シグナル、BMP シグナル、Wnt シグナルと心筋分化に関与することが知られるシグナルは複数存在するが、今回最終的に Wnt シグナルのみを二相性に調整するだけで効率良い心筋分化を得るに至った。マウス胚を用いた検討では、中胚葉の誘導は胎生 5 日に近位胚盤葉外層に NODAL の発現が誘導され、これが近接する胚外外胚葉の BMP4 の発現を維持することから始まるとされる。BMP4 は近位胚盤葉の Wnt3 の発現を上昇させ、これが 5.75 日目に原始線条の T, Eomes などの発現をもたらす¹³。このように Wnt シグナルは中胚葉誘導を構成する Activin, BMP シグナルの下位に位置し、心臓中胚葉の誘導により直接的に関与するため、Wnt シグナルのみを調整する方法が効率的な分化誘導に十分であったと推測される。

今回、複数の Wnt シグナルを活性化する化合物の心筋分化に対する効果を検討した。使用した化合物はいずれも β -catenin の安定化を介して Tcf/Lef 依存的な Wnt 標的遺伝子の発現を活性化するという古典的 Wnt シグナルの活性化剤であったが、結果的に CHIR99021 のみが心筋分化をもたらすことに成功した。他の薬剤はほとんど細胞が生存せず、胚様体が維持できなかった。これは 1 つには CHIR99021 以外の薬剤が幹細胞に対し強い毒性を有していた可能性が考えられる。また、CHIR99021 が細胞の生存・胚様体の維持に関わるような特異的な作

用を有している可能性がある。異なる細胞種においてであるが、CHIR99021 がインスリン受容体に対するインスリン作用を増強させたとの報告がある³⁹。また CHIR99021 を未分化幹細胞に低濃度で使用するにより、その増殖を促すことができることも知られている⁴⁰。iPS 細胞に対して CHIR99021 と他の Wnt 活性化剤とを作用させた上で遺伝子発現を比較し、中胚葉マーカー遺伝子である *T・Mesp1* の誘導以外に CHIR99021 が特異的に変化させている細胞内シグナルや遺伝子ネットワークが明らかとなれば、さらに心筋分化誘導効率を上昇させる手法の開発につながる可能性がある。

CHIR99021 の濃度も分化に大きく影響し、その有効域がかなり狭い範囲に存在することが分かった。今回の実験では、CHIR99021 濃度 3-6 μM で心筋分化誘導が生じたが、3 μM 以下と 6 μM 以上では安定性に乏しく、全く分化しない回も見られたため、4-5 μM での使用が望ましいと思われた。Lian らの単層法の培養での報告では我々と同様に CHIR99021 を中胚葉誘導に用いているが、その濃度を 6-14 μM の範囲で調整する必要があるとしている⁴¹。胚様体と単層法とでの細胞環境の差が至適濃度の違いになったと考えられるが、我々の方法では複数のクローンでの検討によってもこの既報よりも狭い範囲に CHIR99021 の至適範囲が収まっており、クローン・実験ごとで条件を最適化する際の調整が容易で

あると考えられた。

培地交換の日程を変化させて分化誘導効率がどう変わるかを検討した実験からは、Wnt 活性化剤から Wnt 阻害剤への変更のタイミングが心筋分化効率に大きな影響を与えていること、特に CHIR99021 の投与期間を 48 時間にすることが重要であることが判明した。さらに我々は、CHIR99021 の濃度と投与期間を変化させて各段階における胚様体の遺伝子発現変化を調べ、*Sox17* が十分量発現している段階で Wnt シグナルの切り替えを行うことで心筋分化が効率的にもたらされる可能性を示した。マウス胚では、胎生 5.5 日目に Wnt3 が胚盤葉上層で誘導され原始線条での T の発現が上昇した後、予定心臓領域に *Mesp1* の発現が上昇し、胎生 7.0 日に *Mesp1* が Wnt シグナル抑制タンパクである *Dkk1* を誘導することで心臓発生が進むとされる⁴²。したがって、幹細胞からの分化誘導においても *Mesp1* が誘導された後のタイミングで Wnt シグナルを抑制に切り替えることは理に適っている。

Sox17 は内胚葉の HMG-box 転写因子をコードしており、胚体内胚葉の誘導に必要な因子でかつ内胚葉の特異的なマーカーであるとされる⁴³。胚発生の段階で Wnt 阻害作用をもつタンパク *Dkk1* や *Crescent* が隣接する臓側内胚葉から分泌されることで心臓発生が進むことから、心筋分化において内胚葉マーカーが

発現するタイミングと Wnt シグナルを抑制するタイミングを一致させることで効率的な心筋分化が得られるということは合理的と考えられる。Liu らは、マウス ES 細胞を用いた実験で、BIO や Wnt3a の投与により *Sox17* の発現が上昇すること、マウス ES 細胞の *Sox17* に対する shRNA を導入して分化誘導すると *Mesp1* が誘導されず、心筋細胞が得られなくなることを報告している。さらに彼らは 293T 細胞に恒常活性化させた β -catenin と *Sox17* を同時に導入することで β -catenin 転写活性が消失することから、*Sox17* が古典的 Wnt シグナルを抑制する作用を有することを示した⁴⁴。これらの結果は、*Sox17* が Wnt シグナルの活性化によって誘導されながら、*Sox17* 自体は Wnt シグナルの抑制をもたらすという二相性の転換点の鍵を握る因子である可能性を示しており、我々の結果を裏付ける。

心筋分化誘導の際、iPS 細胞クローンによって Wnt シグナルの至適濃度及び Wnt シグナル切り替えのタイミングが異なることが予想される。その最適化の際に、今回判明した遺伝子発現の変化が培地交換のタイミングや心筋分化効率を早期に知るためのマーカーとして利用できる可能性がある。すなわち、CHIR99021 の濃度を振って遺伝子発現、特に *Mesp1* と *Sox17* の発現を時系列でモニタリングし、これらの発現が上昇してからシグナルの切り替え=培地交換を行うことで分化を効率化できる可能性があり、また分化 3-4 日目の初期の段階で

最終的な心筋分化効率を推測できるかもしれない。また、内胚葉細胞培養中の培地上清中の分泌タンパク **Cerberus1** の発現量が細胞の *Sox17* 発現量と相関するという報告があることから⁴⁵、分化過程の培地上清を回収して **Cerberus1** 発現を **ELISA** で解析し、最終的な心筋分化効率と比較することで、細胞の回収を伴わずに培地交換のタイミングのマーカールを見出すことができる可能性がある。現在、分化誘導の初期から分化誘導の最終効率を予見するプロトコルは確立されておらず、今回の知見は分化誘導効率のクローン間差の克服や作業の効率化に役立つ可能性がある。ただし今回の実験は樹立したクローンのうちの1つを使用して行ったものであり、他のクローンでも *Sox17* が同様に **Wnt** シグナルの切り替えを行うタイミングのマーカールとして有用かどうかは追加で検討する余地がある。今後、新たに樹立された **iPS** 細胞クローン、エピソーマル法以外で樹立された **iPS** 細胞クローンで、我々の見出した *Sox17* 遺伝子発現による分化誘導の最適化が可能かを検証したい。

VEGF は心筋分化の促進作用を持つことが報告されている。Ye らはヒト **iPS** 細胞を用いた検討で、心筋分化誘導 1 日目から **Activin A** と **BMP4** を 24 時間作用させ、2 日目から 72 時間 **VEGF** を作用させることで心筋分化誘導を行った。これにより心臓前駆細胞のマーカールである **PDGFR α** の陽性細胞を増加させ、最

最終的に 60-89%の TNNT2 陽性細胞を得ることに成功している⁴⁶。我々の検討でも、分化後期の VEGF の添加により心筋分化効率が上昇する傾向が見られた。VEGF-A の発現を制御している因子に着目し、PDGF, HGF, gonadotropin, TNF α など複数の転写促進因子の中から、VEGF を E2 に置換することを試みた。Estrogen およびその類似化合物が胚様体の分化にどのような影響を及ぼすかについて考察した報告はほとんど存在しない。Jung らは胚様体に様々な合成エストロゲンを作用させ、10 nM で E2 を作用させることにより Oct3/4 の発現が増強すること、最終的な β MHC の発現が上昇することを示したが、そのメカニズムは明らかにされていない⁴⁷。また Brinckmann らはマウス心筋梗塞後の細胞で、心血管前駆細胞のマーカの一つとされる c-kit 陽性細胞を回収し解析を行った。結果 c-kit 陽性細胞では estrogen receptor α の発現が上昇していて、E2 を投与することで心筋細胞の apoptosis の減弱と生存率向上が確認されたとしており、E2 の心筋細胞保護作用が示唆されている⁴⁸。今回の実験では、iPS 細胞からの心筋分化誘導において E2 の心筋細胞に対する直接作用、VEGF の発現増加に対する直接作用は明らかになっておらず、E2 の作用機序の検討が必要である。

SB431542 は TGF β 受容体の特異的な拮抗剤で、TGF β I 型受容体および構造の類似した Activin 受容体 I 型に結合し、ALK4/5/7 を阻害して Activin/Nodal \cdot TGF β

シグナルへの拮抗作用を示す。Kattman らはヒト ES 細胞に Activin A, BMP4 を投与することで心筋分化誘導を行い、それぞれの投与量が心筋分化効率および心臓前駆細胞とされる KDR/PDGFR α 両陽性細胞の割合にどう影響するかを検討した。この報告の中で彼らは SB431542 5 μ M を分化 1 日目から 1 日ずつタイミングをずらして 48 時間投与して分化効率を検討し、3 日目ないし 4 日目から投与することで KDR/PDGFR α 両陽性細胞の割合が著明に増加することを示した³²。

TGF β スーパーファミリーに属する NODAL シグナルは、胚発生の初期においては胚体外胚葉において BMP4 の発現を維持することで中胚葉誘導促進的に働くが、Wnt シグナルと相同的に胚生 6.5 日目以降は前臓側内胚葉から NODAL 拮抗因子である Lefty1 が分泌されることで心筋分化が進むという時期特異的なシグナルの役割変化が知られており¹³、心筋分化誘導においても適切なタイミングで TGF β シグナルを抑制することで心筋分化効率が上昇すると考えられる。一方で、ヒト iPS 細胞に SB431542 を day3 ないし day4 から 2 日間投与したところ、投与しなかった場合と比較しほぼ分化効率は変化しなかったとの報告もある⁴⁹。我々の実験結果でも SB431542 の追加投与は心筋分化効率を改善する傾向は見られたものの、有意差は見られなかった。投与時期や用量についてさらに最適化するのかもしれない。

現状では様々な工夫をもってしても心筋分化の効率を 100%にすることは難しく、心筋分化誘導によって得られた細胞集団には非心筋細胞が混入してしまう。このような非心筋細胞が混ざった集団を移植治療に使用した場合、予期せぬ非心筋細胞の増殖や腫瘍形成を認める可能性がある。また電氣的な同期がうまく起こらず、不整脈を来してしまう危険性がある。また、疾患モデリングに使用する場合にも、非心筋細胞の混入がノイズとなって適切な表現型が観察されなくなり、実験の再現性が低下してしまう恐れがある。

この問題を克服するために Tohyama らは iPS 細胞由来心筋細胞と非心筋細胞の代謝特性の差を利用した手法を開発した²⁰。すなわち、心筋細胞のみが乳酸を基質として代謝できることに着目し、乳酸含有・グルコース不含培地で分化誘導された細胞集団を培養することにより、8 日後にほぼ心筋細胞のみが残存することを報告した。我々の結果でも、8 日間の処理を経ることで同様に 90%以上 TNNT2 陽性の細胞集団を得ることができた。しかし我々の経験では、同濃度の乳酸含有培地を用いてもクローンによって効果が異なり、4 日程度で十分に効果を発揮する場合もあれば、8 日後にも非心筋細胞が残存している場合も認められた。さらに精製直後の心筋細胞は傷害が比較的強く、酵素処理等の実験手技を行うと生存率が低くなってしまう問題、また血清入りグルコース含有培地に戻すとすぐに非心筋細胞が再増殖してしまう問題がある。

心筋細胞のみを選択的に回収する精製手法も試みられている。Dubois らは分化誘導した心筋細胞の表面の CD 抗原をスクリーニングすることで、SIRPA が特異的な心筋細胞マーカーであることを見出した。この抗原に対する抗体を用いた細胞のソーティングにより、TNNT2 が 98%陽性の細胞集団を得ることに成功している⁵⁰。Uosaki らは同様に細胞表面に発現する分子に対する抗体のスクリーニングを行い、VCAM1 が心筋細胞特異的なマーカーであることを報告した⁵¹。これらの方法は抗体およびセルソーターを用いる必要があるため手間と費用がかかること、手技が煩雑であること、収量が良くないこと、細胞が傷んでしまうことなどの短所がある。

Klug らは α MHC 遺伝子のプロモーター支配下にネオマイシン耐性遺伝子を挿入することで、心筋細胞に分化した細胞のみを抗生剤で選択的に獲得できるマウス ES 細胞株を開発した⁵²。以降、様々な心筋細胞特異的遺伝子のプロモーター下に薬剤耐性遺伝子や蛍光タンパク質の遺伝子⁵³を挿入したクローンが開発されている。これらの株は高い効率で心筋細胞を手に入れられるが、遺伝子改変に伴う倫理的問題と安全性の問題からヒトへの移植は不適切である。また多数の iPS 細胞クローンを使用する実験には不向きである。

以上のように心筋細胞の純化方法として簡易でかつ確実な手法は確立されておらず、新しい手法が望まれる。

非心筋細胞の混入のみならず、分化誘導された心筋細胞アイソタイプの heterogeneity は克服されるべき課題である。心房・心室筋タイプの混在は電気的な不均一性を生み、生体に移植した際不整脈の発生源として問題となる。また、ヒト疾患モデルを作成する際も、再現したい心疾患の病変の主座が心室であれば、心室筋型心筋細胞を選択的に用いて解析を行うことが好ましい。

免疫染色による MLC2a, MLC2v 染色の結果により我々の心筋細胞は MLC2v 単独陽性細胞、すなわち心室筋が優位であることが判明した。これまでの心筋分化誘導に関する報告でも誘導心筋の MLC2a/2v 陽性率は検討されており、分化 30-40 日目の段階の評価で Lian らの報告(単層法)で MLC2v 陽性細胞が約 20%、Zhang らの報告(単層法)⁵⁴で約 3%、Burrige らの報告(単層法)⁴⁹で約 30%、Minami らの報告(胚様体法)³⁰で約 60%である。このように胚様体法で分化誘導を行うことで心室筋が優位に得られる可能性があるが、我々の方法においてもアイソタイプの heterogeneity の問題は解決されていない。今回同一個体から樹立した異なる 3 つのクローンから心筋分化誘導し、MLC2a/2v 陽性率を検討したところ、2 つのクローン (UTiPS1-1, 1-3) では 80%以上が MLC2v 陽性を示したのに対し、1 クローン (UT-iPS1-2) では 40%程度の陽性率に留まり、心筋分化後のアイソタイプにはクローン間で差があることが分かった。Huansheng らは、マウス ES

および iPS 細胞を用いた実験で、MLC2v 陽性の心筋細胞から樹立した iPS 細胞は、ES 細胞や同個体の他の体細胞から樹立した iPS 細胞よりもより高い効率で MLC2v 陽性心筋細胞に分化することを示し、その根拠として心筋細胞由来の iPS 細胞では心室筋関連遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態が低く、由来細胞の epigenetic な記憶が残存することを挙げている⁵⁵。さらにこの報告ではこのような樹立元体細胞の違いによる分化志向性の差は iPS 細胞の継代数を経ると小さくなるとしている。これらは iPS 細胞の分化誘導後の特性は由来となる体細胞や iPS 細胞の状態によって容易に異なりうることを示唆しており、我々の分化誘導方法でも、別クローンではまた異なった MLC2a/2v 陽性率を示す可能性がある。こういった誘導細胞の不均一性は、幹細胞を用いた研究の抱える課題の一つであり、epigenetic な状態や分化志向性を決定するメカニズムの解明が期待される。

心房・心室のアイソタイプを選別できる分化誘導方法についてはごくわずかの報告しか存在しない。Zhang らはマウス ES 細胞の分化誘導の初期にレチノイン酸を作用させると ANP 陽性の心房筋細胞が多く誘導されるという報告に着目し、ヒト ES 細胞を単層法で心筋分化させる過程でレチノイン酸およびレチノイン酸阻害剤を作用させ、得られる細胞の特性を解析した。結果レチノイン酸を作用させることで 94%の心筋細胞が心房型の活動電位を示し、レチノイン酸阻害

剤を作用させることで 83%の心筋細胞が心室筋型の活動電位を示したとしている⁵⁶。一方でマウスの ES 細胞を用いた報告では、レチノイン酸が心室筋の割合を増やしたという、相反する報告⁵⁷もあり、その機序の解明と再現性の確認が必要である。現状では心房筋・心室筋アイソタイプを選別して分化誘導できる手法は開発されておらず、今後心房・心室筋のアイソタイプを制御する遺伝子メカニズムの解明が進み、心室筋化を促進する化合物の同定や、心室筋特異的な細胞表面マーカーの同定がなされることが期待される。

本方法を用いて得られた心筋細胞を用いて、今後は臨床応用につながる創薬研究や安全性薬理研究を進めたいと考えている。

現在、心筋症特異的 iPS 細胞由来心筋細胞と健常者 iPS 細胞由来心筋細胞とを比較し、心筋症クローンに特異的に見られる特性を探索している。細胞の形態や内部構造、マイクロアレイによる遺伝子発現の解析、収縮や膜電位などの生理的な表現型の差異を評価し、もっとも良好なシグナル/ノイズ比をもたらす特性を同定すること、またその特性を再現性をもって観測しうる実験系を構築することを試みている。今後、疾患患者から心筋細胞を大量に生産して、96well plate・384well plate などのハイスケールで化合物ライブラリーを作用させてその特性を評価することで、肥大型心筋症患者の心肥大や拡張型心筋症患者の心収縮力

低下を是正する薬剤、ひいては心不全や致死的不整脈の発症を抑制しうる薬剤の開発につなげたい。この手法でヒットする化合物は、これまでの遺伝子改変マウスや心負荷モデルマウスで発見されてきた化合物と異なり、画期的で有効な創薬をもたらす可能性がある。

また、安全性薬理研究では、iPS 細胞由来心筋細胞の膜電位やカルシウムトランジェントを計測することで化合物のヒト心臓への毒性、催不整脈性を検証したり、抗不整脈薬の生体での作用を予見したりする評価系を開発することを目的としている。これによって、現在は動物での投薬実験で確認されている開発中の薬剤の心毒性がより正確に評価されるようになるかもしれない。また現在は臨床的経験に基づき選択される抗不整脈薬の効果が *in vitro* の試験である程度予見できるようになり、治療の個別化に役立つかもしれない。

いずれの研究も新たな臨床研究のアプローチであり、診断や治療上のブレークスルーが期待されるものの、現段階では実験ごとに iPS 細胞由来心筋細胞が示す特性のばらつきが非常に大きいため、まずは iPS 細胞由来心筋細胞の適切な培養条件、播種条件、評価方法を検討し、実験の再現性を高める工夫が不可欠である。

本研究により、スケール拡大が容易な胚様体法を用いて、低分子化合物のみか

ら心筋分化誘導を行う方法を開発した。その過程で使用する Wnt 活性化剤・阻害剤の組み合わせと用量、その切り替えのタイミングを最適化した。またシグナルの切り替えのタイミングの推定に役立つ遺伝子として *Sox17* を見出した。我々のプロトコルは、複数の iPS 細胞クローンから再現性高く多数の心筋細胞を低いコストで得ることに役立つものである。今後は心筋分化方法のクローンごとの最適化プロトコルの開発、アイソタイプごとの心筋細胞の選別方法の開発を試み、さらに均質な心筋細胞を得ることを目標としたい。そして上記のアプローチによって進めている創薬研究・安全性薬理研究を介して、iPS 細胞技術を臨床に役立てることを最終目標としたい。

⑦参考文献

1. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114(6):763-76.
2. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, NY)*. 1998;282(5391):1145-7.
3. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72.
4. Lan F, Lee AS, Liang P, Sanchez-Freire V, Nguyen PK, Wang L, Han L, Yen M, Wang Y, Sun N, Abilez OJ, Hu S, Ebert AD, Navarrete EG, Simmons CS, Wheeler M, Pruitt B, Lewis R, Yamaguchi Y, Ashley EA, Bers DM, Robbins RC, Longaker MT, Wu JC. Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell*. 2013;12(1):101-13.

5. Yazawa M, Hsueh B, Jia X, Pasca AM, Bernstein JA, Hallmayer J, Dolmetsch RE. Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome. *Nature*. 2011;471(7337):230-4.
6. Maron BJ, Maron MS, Semsarian C. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy after 20 years: clinical perspectives. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;60(8):705-15.
7. Ito M, Doi K, Takahashi M, Koyama K, Myojo M, Hosoya Y, Kiyosue A, Ando J, Noiri E, Yahagi N, Hirata Y, Komuro I. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin predicts major adverse cardiovascular events after cardiac care unit discharge. *Journal of cardiology*. 2015.
8. Guo L, Abrams RM, Babiarz JE, Cohen JD, Kameoka S, Sanders MJ, Chiao E, Kolaja KL. Estimating the risk of drug-induced proarrhythmia using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2011;123(1):281-9.
9. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108(3):407-14.

10. Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, Koonce CH, Yu J, Palecek SP, Thomson JA, Kamp TJ. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circulation research*. 2009;104(4):e30-41.
11. Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, Spijker R, van den Brink S, Hassink R, van der Heyden M, Opthof T, Pera M, de la Riviere AB, Passier R, Tertoolen L. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation*. 2003;107(21):2733-40.
12. McDowell N, Gurdon JB. Activin as a morphogen in *Xenopus* mesoderm induction. *Seminars in cell & developmental biology*. 1999;10(3):311-7.
13. Arnold SJ, Robertson EJ. Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009;10(2):91-103.
14. Yuasa S, Itabashi Y, Koshimizu U, Tanaka T, Sugimura K, Kinoshita M, Hattori F, Fukami S, Shimazaki T, Ogawa S, Okano H, Fukuda K. Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nature biotechnology*.

2005;23(5):607-11.

15. Wu X, Golden K, Bodmer R. Heart development in *Drosophila* requires the segment polarity gene *wingless*. *Developmental biology*. 1995;169(2):619-28.

16. Marvin MJ, Di Rocco G, Gardiner A, Bush SM, Lassar AB. Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes & development*. 2001;15(3):316-27.

17. Naito AT, Shiojima I, Akazawa H, Hidaka K, Morisaki T, Kikuchi A, Komuro I. Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(52):19812-7.

18. Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, Roepke TK, Kattman SJ, Kennedy M, Henckaerts E, Bonham K, Abbott GW, Linden RM, Field LJ, Keller GM. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR⁺ embryonic stem-cell-derived population. *Nature*. 2008;453(7194):524-8.

19. Lian X KT, Palecek SP. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cell via temporal modulation of canonical Wnt

signaling. PNAS. 2012;E1848-E57.

20. Tohyama S, Hattori F, Sano M, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Hashimoto H, Suzuki T, Yamashita H, Satoh Y, Egashira T, Seki T, Muraoka N, Yamakawa H, Ohgino Y, Tanaka T, Yoichi M, Yuasa S, Murata M, Suematsu M, Fukuda K. Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell stem cell*. 2013;12(1):127-37.

21. Okita K, Yamakawa T, Matsumura Y, Sato Y, Amano N, Watanabe A, Goshima N, Yamanaka S. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem cells*. 2013;31(3):458-66.

22. Meijer L, Skaltsounis AL, Magiatis P, Polychronopoulos P, Knockaert M, Leost M, Ryan XP, Vonica CA, Brivanlou A, Dajani R, Crovace C, Tarricone C, Musacchio A, Roe SM, Pearl L, Greengard P. GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chemistry & biology*. 2003;10(12):1255-66.

23. Wang W, Walker JR, Wang X, Tremblay MS, Lee JW, Wu X, Schultz PG. Identification of small-molecule inducers of pancreatic beta-cell

expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(5):1427-32.

24. Gwak J, Hwang SG, Park HS, Choi SR, Park SH, Kim H, Ha NC, Bae SJ, Han JK, Kim DE, Cho JW, Oh S. Small molecule-based disruption of the Axin/beta-catenin protein complex regulates mesenchymal stem cell differentiation. *Cell research*. 2012;22(1):237-47.

25. Miyabayashi T, Teo JL, Yamamoto M, McMillan M, Nguyen C, Kahn M. Wnt/beta-catenin/CBP signaling maintains long-term murine embryonic stem cell pluripotency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(13):5668-73.

26. Emami KH, Nguyen C, Ma H, Kim DH, Jeong KW, Eguchi M, Moon RT, Teo JL, Kim HY, Moon SH, Ha JR, Kahn M. A small molecule inhibitor of beta-catenin/CREB-binding protein transcription [corrected]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(34):12682-7.

27. Chen B, Dodge ME, Tang W, Lu J, Ma Z, Fan CW, Wei S, Hao W, Kilgore J, Williams NS, Roth MG, Amatruda JF, Chen C, Lum L. Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue

regeneration and cancer. *Nature chemical biology*. 2009;5(2):100-7.

28. Lu J, Ma Z, Hsieh JC, Fan CW, Chen B, Longgood JC, Williams NS, Amatruda JF, Lum L, Chen C. Structure-activity relationship studies of small-molecule inhibitors of Wnt response. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2009;19(14):3825-7.

29. Huang SM, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, Charlat O, Wiellette E, Zhang Y, Wiessner S, Hild M, Shi X, Wilson CJ, Mickanin C, Myer V, Fazal A, Tomlinson R, Serluca F, Shao W, Cheng H, Shultz M, Rau C, Schirle M, Schlegl J, Ghidelli S, Fawell S, Lu C, Curtis D, Kirschner MW, Lengauer C, Finan PM, Tallarico JA, Bouwmeester T, Porter JA, Bauer A, Cong F. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature*. 2009;461(7264):614-20.

30. Minami I, Yamada K, Otsuji TG, Yamamoto T, Shen Y, Otsuka S, Kadota S, Morone N, Barve M, Asai Y, Tenkova-Heuser T, Heuser JE, Uesugi M, Aiba K, Nakatsuji N. A small molecule that promotes cardiac differentiation of human pluripotent stem cells under defined, cytokine- and xeno-free conditions. *Cell reports*. 2012;2(5):1448-60.

31. Hao J, Daleo MA, Murphy CK, Yu PB, Ho JN, Hu J, Peterson RT,

Hatzopoulos AK, Hong CC. Dorsomorphin, a selective small molecule inhibitor of BMP signaling, promotes cardiomyogenesis in embryonic stem cells. *PloS one*. 2008;3(8):e2904.

32. Kattman SJ, Witty AD, Gagliardi M, Dubois NC, Niapour M, Hotta A, Ellis J, Keller G. Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. *Cell stem cell*. 2011;8(2):228-40.

33. Pages G, Pouyssegur J. Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene--a concert of activating factors. *Cardiovascular research*. 2005;65(3):564-73.

34. Stoner M, Wormke M, Saville B, Samudio I, Qin C, Abdelrahim M, Safe S. Estrogen regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ZR-75 breast cancer cells through interaction of estrogen receptor alpha and SP proteins. *Oncogene*. 2004;23(5):1052-63.

35. Sze Y. Differential gene expressions in atrial and ventricular myocytes: insights into the road of applying embryonic stem cell-derived cardiomyocytes for future therapies. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;299:C1234-49.

36. Mohr JC, Zhang J, Azarin SM, Soerens AG, de Pablo JJ, Thomson JA, Lyons GE, Palecek SP, Kamp TJ. The microwell control of embryoid body size in order to regulate cardiac differentiation of human embryonic stem cells. *Biomaterials*. 2010;31(7):1885-93.
37. Kempf H, Olmer R, Kropp C, Ruckert M, Jara-Avaca M, Robles-Diaz D, Franke A, Elliott DA, Wojciechowski D, Fischer M, Roa Lara A, Kensah G, Gruh I, Haverich A, Martin U, Zweigerdt R. Controlling expansion and cardiomyogenic differentiation of human pluripotent stem cells in scalable suspension culture. *Stem cell reports*. 2014;3(6):1132-46.
38. Fonoudi H, Ansari H, Abbasalizadeh S, Larijani MR, Kiani S, Hashemizadeh S, Zarchi AS, Bosman A, Blue GM, Pahlavan S, Perry M, Orr Y, Mayorchak Y, Vandenberg J, Talkhabi M, Winlaw DS, Harvey RP, Aghdami N, Baharvand H. A Universal and Robust Integrated Platform for the Scalable Production of Human Cardiomyocytes From Pluripotent Stem Cells. *Stem cells translational medicine*. 2015;4(12):1482-94.
39. Ring DB, Johnson KW, Henriksen EJ, Nuss JM, Goff D, Kinnick TR, Ma ST, Reeder JW, Samuels I, Slabiak T, Wagman AS, Hammond ME, Harrison SD. Selective glycogen synthase kinase 3 inhibitors potentiate

insulin activation of glucose transport and utilization in vitro and in vivo.

Diabetes. 2003;52(3):588-95.

40. Ye S, Tan L, Yang R, Fang B, Qu S, Schulze EN, Song H, Ying Q, Li P.

Pleiotropy of glycogen synthase kinase-3 inhibition by CHIR99021 promotes

self-renewal of embryonic stem cells from refractory mouse strains. PloS one.

2012;7(4):e35892.

41. Lian X, Zhang J, Azarin SM, Zhu K, Hazeltine LB, Bao X, Hsiao C,

Kamp TJ, Palecek SP. Directed cardiomyocyte differentiation from human

pluripotent stem cells by modulating Wnt/beta-catenin signaling under fully

defined conditions. Nature protocols. 2013;8(1):162-75.

42. David R, Brenner C, Stieber J, Schwarz F, Brunner S, Vollmer M,

Mentele E, Muller-Hocker J, Kitajima S, Lickert H, Rupp R, Franz WM.

MesP1 drives vertebrate cardiovascular differentiation through Dkk-1-

mediated blockade of Wnt-signalling. Nature cell biology. 2008;10(3):338-45.

43. Kanai-Azuma M, Kanai Y, Gad JM, Tajima Y, Taya C, Kurohmaru M,

Sanai Y, Yonekawa H, Yazaki K, Tam PP, Hayashi Y. Depletion of definitive

gut endoderm in Sox17-null mutant mice. Development. 2002;129(10):2367-

79.

44. Liu Y, Asakura M, Inoue H, Nakamura T, Sano M, Niu Z, Chen M, Schwartz RJ, Schneider MD. Sox17 is essential for the specification of cardiac mesoderm in embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(10):3859-64.
45. Iwashita H, Shiraki N, Sakano D, Ikegami T, Shiga M, Kume K, Kume S. Secreted cerberus1 as a marker for quantification of definitive endoderm differentiation of the pluripotent stem cells. *PloS one*. 2013;8(5):e64291.
46. Ye L, Zhang S, Greder L, Dutton J, Keirstead SA, Lepley M, Zhang L, Kaufman D, Zhang J. Effective cardiac myocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells requires VEGF. *PloS one*. 2013;8(1):e53764.
47. Jung EM, Choi KC, Yu FH, Jeung EB. Effects of 17beta-estradiol and xenoestrogens on mouse embryonic stem cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2010;24(6):1538-45.
48. Brinckmann M, Kaschina E, Altarche-Xifro W, Curato C, Timm M, Grzesiak A, Dong J, Kappert K, Kintscher U, Unger T, Li J. Estrogen receptor alpha supports cardiomyocytes indirectly through post-infarct cardiac c-kit+ cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2009;47(1):66-75.

49. BurrIDGE PW, Matsa E, Shukla P, Lin ZC, Churko JM, Ebert AD, Lan F, Diecke S, Huber B, Mordwinkin NM, Plews JR, Abilez OJ, Cui B, Gold JD, Wu JC. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nature methods*. 2014;11(8):855-60.
50. Dubois NC, Craft AM, Sharma P, Elliott DA, Stanley EG, Elefanty AG, Gramolini A, Keller G. SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Nature biotechnology*. 2011;29(11):1011-8.
51. Hideki Uosaki JKY. Efficient and scalable purification of cardiomyocytes from human embryonic and induced pluripotent stem cells by VCAM1 surface expression. *PloS one*. 2011;6(8):e23657.
52. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *The Journal of clinical investigation*. 1996;98(1):216-24.
53. Gassanov N, Er F, Zagidullin N, Hoppe UC. Endothelin induces differentiation of ANP-EGFP expressing embryonic stem cells towards a pacemaker phenotype. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004;18(14):1710-2.

54. Zhang J, Klos M, Wilson GF, Herman AM, Lian X, Raval KK, Barron MR, Hou L, Soerens AG, Yu J, Palecek SP, Lyons GE, Thomson JA, Herron TJ, Jalife J, Kamp TJ. Extracellular matrix promotes highly efficient cardiac differentiation of human pluripotent stem cells: the matrix sandwich method. *Circulation research*. 2012;111(9):1125-36.
55. Xu H, Yi BA, Wu H, Bock C, Gu H, Lui KO, Park JH, Shao Y, Riley AK, Domian IJ, Hu E, Willette R, Lepore J, Meissner A, Wang Z, Chien KR. Highly efficient derivation of ventricular cardiomyocytes from induced pluripotent stem cells with a distinct epigenetic signature. *Cell research*. 2012;22(1):142-54.
56. Zhang Q, Jiang J, Han P, Yuan Q, Zhang J, Zhang X, Xu Y, Cao H, Meng Q, Chen L, Tian T, Wang X, Li P, Hescheler J, Ji G, Ma Y. Direct differentiation of atrial and ventricular myocytes from human embryonic stem cells by alternating retinoid signals. *Cell research*. 2011;21(4):579-87.
57. Wobus AM, Kaomei G, Shan J, Wellner MC, Rohwedel J, Ji G, Fleischmann B, Katus HA, Hescheler J, Franz WM. Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular*

cardiology. 1997;29(6):1525-39.

⑧謝辞

本研究を実施するにあたり、その機会と多大なご指導を賜りました東京大学医学系研究科循環器内科 小室一成教授に深く感謝いたします。本研究の立案、遂行、実験につき直接ご指導くださり、多数のご助言をいただきました東京大学大学院医学系研究科・肺高血圧先進医療研究学寄付講座特任助教 内藤篤彦先生に特に感謝いたします。iPS 細胞の培養技術につきご指導いただいた国立成育医療研究センター副所長・再生医療センター長 梅澤明弘先生に感謝いたします。また日々の研究生活に多くのご支援をいただいた東京大学大学院医学系研究科循環器内科 iPS 創薬グループの研究員の皆様、技術補佐員の皆様に心より御礼申し上げます。

そして大学院生活のみならず、様々な面において深い理解と支援を注いでくれた両親に、この場を借りて感謝致します。