

論文の内容の要旨

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

(序文)

iPS (induced pluripotent stem) 細胞は、体細胞に山中 4 因子を導入することで作製される多能性幹細胞であり、ES (embryonic stem) 細胞と同様に無限の増殖能と多分化能を有している。ヒト ES 細胞と異なり、ヒト iPS 細胞は樹立にあたっての倫理的な問題がないという利点と、由来となる体細胞と同一のゲノムを保持しているという特性を有しており、循環器分野でも再生医療と疾患モデリングを目的として iPS 細胞由来心筋細胞を利用した研究が進んでいる。現時点での iPS 細胞を用いた心疾患研究の最大の障壁の一つは、iPS 細胞から心筋細胞を分化誘導することが容易でない点にある。

多能性幹細胞から心筋細胞を分化誘導する方法はすでに複数報告されている。多能性幹細胞を小細胞塊で浮遊培養して胚様体とよばれる細胞塊を形成するか (胚様体法)、多能性幹細胞を単細胞に解離して特定の基質の上に高密度で播種する (単層法) ことにより幹細胞からの分化が進み、一部が拍動する心筋細胞となりうるということが知られている。さらに近年の報告により、心臓発生に重要な役割を果たしている Activin シグナル・BMP (bone morphogenetic protein) シグナル・Wnt シグナルなどの様々なシグナル経路の変化を試験管内で模倣することで効率的な心筋分化誘導が得られることが判明している。Activin A は TGF (transforming growth factor) β スーパーファミリーに属し、中胚葉誘導作用をもつ。BMP も TGF β スーパーファミリーに属する細胞増殖因子であり、心臓発生の初期には中胚葉誘導に促進的に作用することで心筋分化を促進する一方、中胚葉誘導後には一過性に心臓発生に抑制的に作用する。Wnt シグナルは個体の発生や発がんに関与するシグナル伝達経路で、心臓発生においては時期特異的に二相性の作用を示し、心臓発生の中胚葉誘導の段階では心筋分化に対して促進的に作用する一方で、後期の段階では抑制的に作用する。これらの心臓発生に関するシグナルの知見に基づき、多能性幹細胞の培養液中にこれらのシグナル伝達を促進、あるいは抑制する化合物を特定の時期に加え、心臓の発生過程を培養皿中で再現することによって効率よい分化誘導を試みる手法が多く採られている。

これらの化合物の選択や組み合わせについては多様な報告があるものの、効率の点から絶対的なものは存在しない。また、既報は血清や複数のサイトカインを使用するプロトコルが大半であるが、試薬のロット間差が大きく分化誘導の再現性が低くなることと、コストが高くなることが問題である。

本研究において私は、再現性高く効率的な分化誘導方法を開発するため、胚様体形成により分化を開始し、サイトカインや血清を使用せずに低分子化合物を添加することでヒト iPS

細胞から心筋分化誘導する方法の開発を試みた。心臓発生におけるシグナルの変化を培養過程で模倣する手法に基づき、Wnt シグナルを活性化・抑制する化合物を胚様体に順に作用させることで分化誘導を行った。その過程で使用する化合物の種類と用量、投与期間の最適化を行い、複数の iPS 細胞クローンにおいて効率的な心筋分化誘導をもたらす方法を開発した。また心筋分化誘導各段階で遺伝子発現解析を行い、分化誘導プロトコルを最適化する手がかりとなるマーカー遺伝子を同定した。

(方法、結果)

健康人および拡張型心筋症・肥大型心筋症患者各 3 名ずつから末梢血を採取し、単核球前駆細胞を分離した後、山中 4 因子を含むエピソーマルプラスミドをエレクトロポレーション法で導入することにより iPS 細胞を樹立した。

iPS 細胞から胚様体を形成することで分化誘導を開始し、翌日（分化 1 日目）から 2 日間 Wnt シグナル活性化剤を含む培地で胚様体を培養し、分化 3 日目に Wnt シグナル阻害剤および VEGF(vascular endothelial growth factor) を含む培地へと交換して培養した。分化 8 日目以降は Wnt 活性化剤・阻害剤いずれも含まず、VEGF と bFGF(basic fibroblast growth factor) を含む培地に交換して培養を継続した。分化 16 日目に拍動する胚様体の割合を記録し、心筋細胞への分化効率の指標とした。

1) 分化開始後の初期に種類の異なる Wnt シグナル活性化剤 (CHIR99021, BIO, Wnt agonist, Wnt agonist II) を作用させ、心筋分化効率を比較した。これら中で GSK (glycogen synthase kinase) 3 β 阻害剤である CHIR99021 でのみ胚様体の良好な生存と拍動が得られた。さらに CHIR99021 の濃度を変化させて心筋分化効率を検討したところ、3-6 μ M の範囲で投与したときに分化 10-12 日目から拍動する胚様体が確認された。クローン間のばらつきを考慮すると 4-5 μ M での使用が最も好ましいことが明らかとなった。

2) Wnt 活性化剤を CHIR99021 5 μ M に固定し、Wnt 阻害剤の種類を変えて (IWP2, IWR1, XAV939, KY02111) 心筋分化誘導を行い、分化効率を比較した。その結果、各化合物で適切な濃度を設定すれば、化合物の種類によらずほぼ同様に効率的な心筋分化が誘導された。その中でも、内因性の Wnt タンパクの分泌を阻害する Porcupine 阻害剤 IWP2 を 5 μ M で使用したときに最も良好な心筋分化が得られた。

3) Wnt シグナルを活性化から抑制に切り替えるタイミングの最適化を試みた。Wnt 活性化剤を含む培地から阻害剤を含む培地へ交換するタイミングを分化 2, 3, 4 日目と変化させて分化誘導を行った結果、分化 3 日目での培地交換が最も効率的な分化をもたらした。4 日目の培地交換でも心筋への分化は見られたが、効率は約 1/3 に低下した。2 日目の培地交換では胚様体がほぼ生存せず、心筋分化はほとんど得られなかった。

4) CHIR99021 を 1, 4, 10 μM と変化させて心筋分化誘導を行い、胚様体の遺伝子発現を定量的 PCR 法で解析した。分化 3 日目・6 日目における中胚葉マーカー *T*、心臓中胚葉マーカー *Mesp1* や、心筋前駆細胞マーカー *Nkx2.5* などの遺伝子の発現の多寡は最終的な心筋細胞誘導効率と関連しなかった。一方、心筋分化効率の良い 4 μM の条件では、3 日目に内胚葉マーカー遺伝子 *Sox17* の発現が上昇していた。

また、Wnt 活性化剤を作用させる期間を変化させ、遺伝子発現の時系列変化を検討した。CHIR99021 4 μM を培地中に添加して胚様体を培養し、1-4 日後の各胚葉マーカーの発現を比較した。*T*、*Mesp1* の発現は分化 3 日目に急な上昇を迎えるが、分化 4 日目から速やかにその発現が消失した。分化 4 日目以降までの長期の CHIR99021 の投与により、*Pax6* や *Sox1* などの外胚葉マーカーの発現が上昇した。また、Wnt シグナルの切り替えのタイミングで *Sox17* の発現量が多いほど、分化 16 日目の心筋細胞マーカーの発現量も多くなることが分かった。

以上より *Sox17* の発現上昇と Wnt シグナルの切り替えのタイミングを一致させることで効率よい心筋分化がもたらされる可能性が示唆された。

5) サイトカインを用いない分化誘導方法を確立するため、CHIR99021(4 μM)と IWP2(5 μM)を固定し、分化 3 日目以降に添加する VEGF, bFGF を低分子化合物に置換することを試みた。TGF β シグナルの阻害剤である SB431542 (5 μM) を分化 3 日目から 6 日目までに、またプロモーター領域に結合し VEGF の発現を増加させる作用が報告されている estradiol (100 nM) を分化 3 日目以降に添加したところ、サイトカインを使用した分化誘導法とほぼ同等の分化効率を得た。

今回開発した低分子化合物からなる心筋分化誘導方法で、心筋症患者由来 iPS 細胞を含め、分化誘導を試みたすべてのクローンで心筋分化誘導に成功した。

6) 本法で得られた心筋細胞の性質を評価した。得られた細胞集団を乳酸含有・グルコース不含培地で 8 日間培養することにより非心筋細胞を除去する方法で心筋細胞を精製した後、フローサイトメトリーで解析を行い、90%以上の細胞が TNNT2 陽性であることを確認した。また、心室筋・心房筋それぞれに特異的なミオシン軽鎖である MLC2v・MLC2a の免疫染色により、開発したプロトコルで得られる心筋細胞は心室筋型が優位であることが示された。

(考察)

本研究においてヒト iPS 細胞から心筋細胞を分化誘導する新規の方法を開発した。iPS 細胞から形成した胚様体を、CHIR99021 4-5 μM を含む培地で 2 日間培養した後、IWP2 5 μM を含む培地で 5 日間培養することで最も効率的な心筋分化誘導方法を得た。さらに分化 3 日目から SB431542 と estradiol を併用し、低分子化合物のみからなる分化プロトコルの確立に

成功した。本方法は生体の心臓発生における Wnt シグナルの二相性の変化を模倣している点で生理的であり、またシグナルの操作を最適な低分子化合物の組み合わせで行うために頑健性が高いと考えられる。さらに胚様体の浮遊培養法を用いた方法であるため培養スケールを拡大することが容易であること、コストが従来の代表的な方法の約 1/25 に削減されていることが本方法の長所である。このプロトコルの有する効率・再現性・経済性は、今後複数の患者個々由来の iPS 細胞を用いた心疾患の臨床研究を遂行するのに有利な方法であり、疾患特異的 iPS 細胞由来心筋細胞を用いた病態解明研究や創薬研究への応用に役立つと考えられる。