

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 伊藤 正道

本研究は、ヒト iPS 細胞から心筋細胞を分化誘導する新規の手法の開発を試みたものである。現在までの iPS 細胞からの心筋分化誘導方法は、生理活性タンパク質や成長因子を用いるために実験間の再現性が低い点や、スケールの拡大が容易でない点が問題であった。これらを解決するために浮遊培養法を用い、低分子化合物のみからなる分化誘導プロトコルの開発を試み、以下の結果を得ている。

1. 健常者および拡張型心筋症・肥大型心筋症患者の末梢血単核球から、エピソーマルプラスミドをエレクトロポレーションによって導入することによって iPS 細胞を樹立した。またその未分化マーカーの発現を免疫染色により確認した。
2. 胚発生において古典的 Wnt シグナルは二相性の役割を果たしており、発生初期の中胚葉誘導には促進的に作用するのに対し、中胚葉誘導以降の心筋細胞誘導には抑制的に作用することが知られている。このことに着目し、胚様体に Wnt 活性化剤⇒Wnt 阻害剤を順に作用させて心臓発生過程のシグナル伝達経路の変化を模倣することで心筋分化誘導を試みた。その中で、①Wnt 活性化剤の種類、②Wnt 阻害剤の種類、③Wnt 活性化⇒抑制のタイミング の最適化を行った。
 - 2-①. 分化開始後早期(1-3 日目)に、Wnt シグナル活性化剤 CHIR99021, BIO, Wnt agonist, Wnt agonist II を異なる濃度で作用させ、分化開始 16 日目の心筋分化効率を比較した。その結果、GSK3 β 阻害剤である CHIR99021 を 4-5 μ M で使用したときに最も効率の良い心筋分化が得られた。
 - 2-②. Wnt 活性化剤を CHIR99021 5 μ M に固定し、分化開始後 3-8 日目に Wnt 阻害剤 IWP2, IWR1, XAV939, KY02111 を異なる濃度で作用させ、心筋分化効率を比較した。その結果、Porcupine 阻害剤である IWP2 を 5 μ M で使用したときに最も効率の良い心筋分化が得られた。
 - 2-③. 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。上記 CHIR99021 と IWP2 の組み合わせを固定し、分化開始後 2-4 日目で薬剤の切り替えを行った。その結果、分化 3 日目でのシグナルの切り替えが最も効率的な分化をもたらすことが分かった。
3. 心筋分化誘導における Wnt シグナル活性化剤 CHIR99021 の至適濃度と至適投与期間が狭い範囲にあることから、これらの条件を振って心筋分化誘導を行い、遺伝子発現の時系

列変化と最終的な心筋分化効率の関連を検討した。その結果、CHIR99021の濃度と作用期間によって内胚葉マーカー遺伝子である*Sox17*の発現のピークが変化すること、*Sox17*の発現が高いときにWntシグナルの活性化→抑制の切り替えを行うと効率よい心筋分化誘導をもたらされる可能性が示唆された。

4. TGF β シグナル阻害剤の投与およびVEGFの投与が幹細胞からの心筋分化誘導を促進することが報告されている。このことに着目し、上記のCHIR99021とIWP2の組み合わせに加え、分化3日目から6日目にTGF β 阻害剤SB431542、ならびにVEGFの発現を促進する作用を持つestradiolを投与した。その結果、既報の心筋分化誘導と同等以上の分化効率を得、完全に低分子化合物のみからなる心筋分化誘導法の開発に成功した。
5. 当方法で分化誘導した細胞集団を乳酸含有・グルコース不含培地で培養することによって精製した後、フローサイトメトリーで90%以上の細胞がTNNT2陽性であることを確認した。またミオシン軽鎖MLC2a/2vの免疫染色により、本法ではMLC2v陽性の心室筋型心筋細胞が優位に誘導されることが判明した。
6. 開発した手法の再現性を確認するため、健常者由来・拡張型心筋症患者由来・肥大型心筋症患者由来iPS細胞各3クローンの計9クローンで分化誘導を試み、どのクローンでもTNNT2陽性の細胞集団が分化誘導されることを確認した。

本報告では、浮遊培養の系でかつ低分子化合物のみを用いて分化誘導を行う新規のヒトiPS細胞からの心筋分化誘導プロトコルの開発に成功している。本方法の開発によって幹細胞からの分化誘導スケールの拡大と再現性の向上、コスト削減が達成されるため、本法は今後のiPS細胞を用いた疾患研究の遂行に大いに役立つと考えられ、学位授与に値するものと考えられる。