

第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

Spatiotemporal imaging documented the maturation of the cardiomyocytes from human induced pluripotent stem cells

時空間イメージング法によるヒト iPS 細胞から分化した
心筋細胞の成熟過程の実証

日本医科大学大学院医学研究科 心臓血管外科学分野
大学院生 青山 純也

Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery (2019 年) 掲載予定

DOI: 10.1016/j.jtcvs.2019.06.060. [Epub ahead of print]

ヒト iPS 細胞が樹立されてから、様々な細胞や臓器の再生研究が進められている。循環器再生医療の分野では、再生生体素材としての心筋細胞に期待が寄せられているが、拍動心筋の作製や小動物への移植実験が行われているものの、今までに、ヒトへの応用や iPS 細胞の移植によって劇的に心機能が改善したという報告はない。その原因の一つとして、ヒト iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞は、分化の初期段階では幼弱な状態である事が多く、分化が進むにつれて徐々に拍動の同期性や頻度が成熟してくることが考えられる。本研究では、同期性収縮や律動的な拍動を開始する心筋細胞塊の分化の時間的、空間的過程に関して、免疫組織化学染色法、電気生理学的解析方法、遺伝子学的解析方法と、さらに新たな動態解析方法として時空間イメージング法（時間周波数解析）により、それらの分化段階に応じた拍動の動態変化を明らかにし、今後の移植可能な再生生体素材の開発に関する基礎的な実証を行った。

ゲノム編集技術（CRISPR/Cas9）を応用して、未熟心筋のマーカーである α MHC の発現を蛍光タンパク（Green Fluorescent Protein）の発現で可視化した細胞ラインと、ペースメーカー細胞のマーカー遺伝子 *HCN4* の発現を蛍光タンパク（Yellow Fluorescent Protein）の発現で標識した細胞ラインを作製し、三次元培養法で胚葉体（心筋細胞塊）を形成したのちに、バイオリアクター装置で攪拌培養を行いながら、各種サイトカイン（bFGF, BMP4, Activin-A, IWR-1, VEGF）を各分化段階に応じて作用させて効率的な分化誘導を行った。接着培養に移した後に、拍動を開始する心筋細胞塊を確認した。分化開始後 50 日未満の初期段階、50 日から 100 日未満の中期段階、そして 100 日以降の後期段階にある拍動心筋細胞塊に対して、拍動の動的な変化を時間周波数解析によって、電気生理学的な変化をカルシウムイメージング法で、そして心筋細胞に特異的な mRNA の発現程度の変化を定量 RT-PCR によって、

各分化段階についてそれぞれ評価した。時間周波数解析では、拍動を構成する優位な周波数 (dominant frequency) を同定し、そのパワースペクトルを算出した。分化初期段階では、周波数の少ない波形が目立ったことに加え、ノイズの多い波形として示された。中期になると、拍動を構成する周波数の波形が明瞭に、かつ様々な周波数が認められ、特に周波数の大きい波形が初期段階と比較すると明らかに生じている事が示された。分化後期では、優位な波形の形状は保たれたまま周波数が漸減していた。これは拍動回数が減少し、なおかつ全体的に拍動が同期し始めていることを示している。遺伝子解析では、それぞれの分化段階の細胞塊に発現する mRNA の相対的発現量の比較・評価を行った。分化段階が進むにつれて K^+ チャンネルやギャップ結合を司る遺伝子の発現が、分化開始後 70 日目以降に有意に上昇し、免疫染色でもギャップ結合の発現の変化は捉えられており、徐々に心筋細胞を取り囲うように発現していた。一方で未熟心筋に発現する *MYH6* は分化日数が進むにつれて有意に低下する事が確認され、心筋の経時的成熟が示唆された。さらにペースメーカー細胞のマーカー遺伝子である *HCN4* は、分化段階が進むにつれて有意に低下し、拍動頻度の減少の機序として示唆された。これらの総合的な評価・解析結果から、分化開始後 70 日目以降より、徐々に遺伝子発現やタンパク発現の程度が明らかに変化し、心筋の成熟過程が進むにつれて拍動頻度が低下し、拍動が同期する心筋細胞塊へと成熟したと考えられる。以上の結果から、ヒト iPS 細胞から分化した心筋細胞塊は、ギャップ結合が構築され、それにより細胞塊全体が同期拍動するような興奮伝播の様式に変化が認められた。周囲細胞との同期が得られるためには、分化後 70 日以上が必要であることが、本研究で行われた時間周波数解析、遺伝子解析、電気生理学的解析から明らかになった。また、ペースメーカー細胞に関与する *HCN4* の経時的発現低下から、本研究で用いた細胞塊は、分化過程においてペースメーカー細胞から作業心筋への分化が生じている事が示唆された。これらの結果は、今後の心筋再生医療における移植可能な生体素材の開発に対して、有益な研究結果であると考えられる。

論文の第二次審査では研究手法の確認、データの解釈、従来の研究との相違について質問があり、いずれに対しても文献的考察とともに的確な回答が得られた。さらに本研究に関連する研究分野に関する質問に対しても科学的視点に立った返答が得られた。以上のことから本論文は学位論文として価値のあるものと認定した。