

Title	In vivo differentiation of induced pluripotent stem cell-derived Cardiomyocytes
Author(s)	于, 涛
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/50611">https://hdl.handle.net/11094/50611</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	于 涛 (Tao Yu)
博士の専攻分野の名称	博士 (保健学)
学位記番号	第 26126 号
学位授与年月日	平成25年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科保健学専攻
学位論文名	In vivo differentiation of induced pluripotent stem cell-derived Cardiomyocytes (人工多能性幹細胞由来心筋細胞の生体内における分化)
論文審査委員	(主査) 教授 松浦 成昭 (副査) 教授 稲垣 忍 教授 中谷 敏

## 論文内容の要旨

〔背景〕心不全は致死的な病態であり、薬物や人工臓器による治療では限界があり、移植治療もドナー不足から多数例に施行することは難しい。新しい治療法として、再生医療が注目を集め、骨髄細胞、筋芽細胞を用いた細胞治療が臨床応用され、一定の効果は得られたが不十分で、最大の問題点として心筋細胞への分化が認められないことが報告された。近年、iPS (induced pluripotent stem) 細胞の研究の進歩とともに、in vitroで心筋細胞への分化も可能となったが、生体に移植された心筋細胞の構造・機能の詳細は明らかにされていない。今までiPS細胞由来心筋細胞の心筋転写因子、構造蛋白、収縮蛋白などの発現や局在は報告されたが、微細構造や特に生体に移植した際、ホスト心筋細胞外基質への接着に必要な接着分子 $\alpha$ -dystroglycan、 $\alpha$ -sarcoglycan、laminin- $\alpha$ 2などの発現、およびiPS細胞由来心筋細胞成熟化の原因がほとんど報告されなかった。

〔目的〕iPS細胞由来心筋細胞が心筋細胞特異的な収縮蛋白、構造蛋白などをその細胞内に局在性を持って発現しており、ミトコンドリアを初めとする細胞内小器官が心筋と同様の構造、機能を有していて、生体に移植した際にホスト心筋細胞外基質に接着する接着分子を発現していることを仮説とし、これらのことを分子病理学的に検討した。

〔方法〕6週齢のF344/NJc1ヌードラットの心臓に、分化16日目のiPS細胞由来心筋細胞シートを移植し、2週間後に移植した細胞シートを取り出して、免疫蛍光染色法及び電子顕微鏡法などによって解析を行った。iPS細胞から心筋細胞への分化は無血清でInsulin-Transferrin-Selenium-Xの添加によって行った。

〔結果〕iPS細胞から作成された心筋細胞 (iPSC-CM) は胚様体 (EB) 形成12日目頃から、心筋の最大の特徴である自律的収縮が観察され、16日目に7割のEBに拍動が認められた。心筋への分化過程において心筋特異的転写因子GATA4、Nkx2.5が早期から強く発現し、構造蛋白MLC2a、収縮蛋白cTnTの発現は徐々に増加した。

免疫染色にてiPSC-CMには胎児心筋細胞と同様に骨格蛋白MHCと胎児型心筋マーカー $\beta$ MHCが強く発現し、成体型心筋マーカー $\alpha$ MHCはほとんど発現が見られなかった。電子顕微鏡では、心筋に特徴的とされる横紋構造、Z盤、多数のミトコンドリアなども観察されたが、胎児心筋細胞と比較して、ミトコンドリアのクリスタは疎であり、量的にも少ない傾向が見られた。

iPSC-CMは細胞外基質への接着に必要な接着分子N-cadherin、 $\alpha$ 7-integrin、dystrophin、 $\alpha$ -dystroglycan、 $\alpha$ -sarcoglycan、laminin- $\alpha$ 2が強く発現し、それを反映してラット心への移植に際して良好な生着を示した。しかも、生着したiPSC-CMにはin vitroで認められなかった $\alpha$ MHCの高発現が認められ、胎児型心筋細胞から成熟心筋細胞への転換が起こったと考えられた。また、規則的な細胞内局在の見られなかったギャップ結合タンパクconnexin43もin vivoでは心筋細胞の介在板に発現していた。これらの形態学的変化はin vitroにおける増殖因子の刺激だけでは見られなかったため、心筋細胞が生体環境でstretchされることにより誘導された可能性が推測された。そこでin vitroでiPSC-CMに対して、種々の増殖因子や機械的な進展刺激を与えた所、IGF1添加と機械的伸展刺激によって成熟心筋細胞への分化が誘導される結果が得られた。

〔考察〕iPSC-CMは胎児型心筋のphenotypeを有しており、dystrophin-dystroglycan complex系の接着分子を介して生体心臓に生着する可能性が考えられた。in vivoに移植するとiPSC-CMは胎児型から成熟型心筋に分化し、connexin43の発現パターンも変化していた。これらのin vivoにおける分化は生体環境における収縮伸展による物理的刺激がトリガーになっている可能性が考えられた。以上より、iPSC-CMは生体心臓へ移植すると成熟型心筋に分化ことから、将来、再生医療に応用できる可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は6週齢のF344/NJc1ヌードラットの心臓に、分化16日目のiPS細胞由来心筋細胞シートを移植し、2週間後に移植した細胞シートを取り出して、免疫蛍光染色法及び電子顕微鏡法などによって解析を行った。

iPS細胞から作成された心筋細胞 (iPSC-CM) は胚様体 (EB) 形成12日目頃から、心筋の最大の特徴である自律的収縮が観察され、16日目に7割のEBに拍動が認められた。心筋への分化過程において心筋特異的転写因子GATA4、Nkx2.5が早期から強く発現し、構造蛋白MLC2a、収縮蛋白cTnTの発現は徐々に増加した。

免疫染色にてiPSC-CMには胎児心筋細胞と同様に骨格蛋白MHCと胎児型心筋マーカー $\beta$ MHCが強く発現し、成体型心筋マーカー $\alpha$ MHCはほとんど発現が見られなかった。電子顕微鏡では、心筋に特徴的とされる横紋構造、Z盤、多数のミトコンドリアなども観察されたが、胎児心筋細胞と比較して、ミトコンドリアのクリスタは疎であり、量的にも少ない傾向が見られた。

iPSC-CMは細胞外基質への接着に必要な接着分子N-cadherin、 $\alpha$ 7-integrin、dystrophin、 $\alpha$ -dystroglycan、 $\alpha$ -sarcoglycan、laminin- $\alpha$ 2が強く発現し、それを反映してラット心への移植に際して良好な生着を示した。しかも、生着したiPSC-CMにはin vitroで認められなかった $\alpha$ MHCの高発現が認められ、胎児型心筋細胞から成熟心筋細胞への転換が起こったと考えられた。また、規則的な細胞内局在の見られなかったギャップ結合タンパクconnexin43もin vivoでは心筋細胞の介在板に発現していた。これらの形態学的変化はin vitroにおける増殖因子の刺激だけでは見られなかったため、心筋細胞が生体環境でstretchされることにより誘導された可能性が推測された。そこで、in vitroでiPSC-CMに対して、種々の増殖因子や機械的な進展刺激を与えた所、IGF1添加と機械的伸展刺激によって成熟心筋細胞への分化が誘導される結果が得られた。

iPSC-CMは胎児型心筋のphenotypeを有しており、dystrophin-dystroglycan complex系の接着分子を介して生体心臓に生着する可能性が考えられた。in vivoに移植するとiPSC-CMは胎児型から成熟型心筋に分化し、connexin43の発現パターンも変化していた。これらのin vivoにおける分化は生体環境における収縮伸展による物理的刺激がトリガーになっている可能性が考えられた。iPSC-CMは生体心臓へ移植すると成熟型心筋に分化ことから、将来、再生医療に応用できる可能性が示唆された。

この研究は、iPS細胞から作成された心筋細胞の微細構造及び成熟のメカニズムを初めて報告され高く評価できる。以上のことにより、本論文は博士 (保健学) の学位授与に値するものと考えられる。