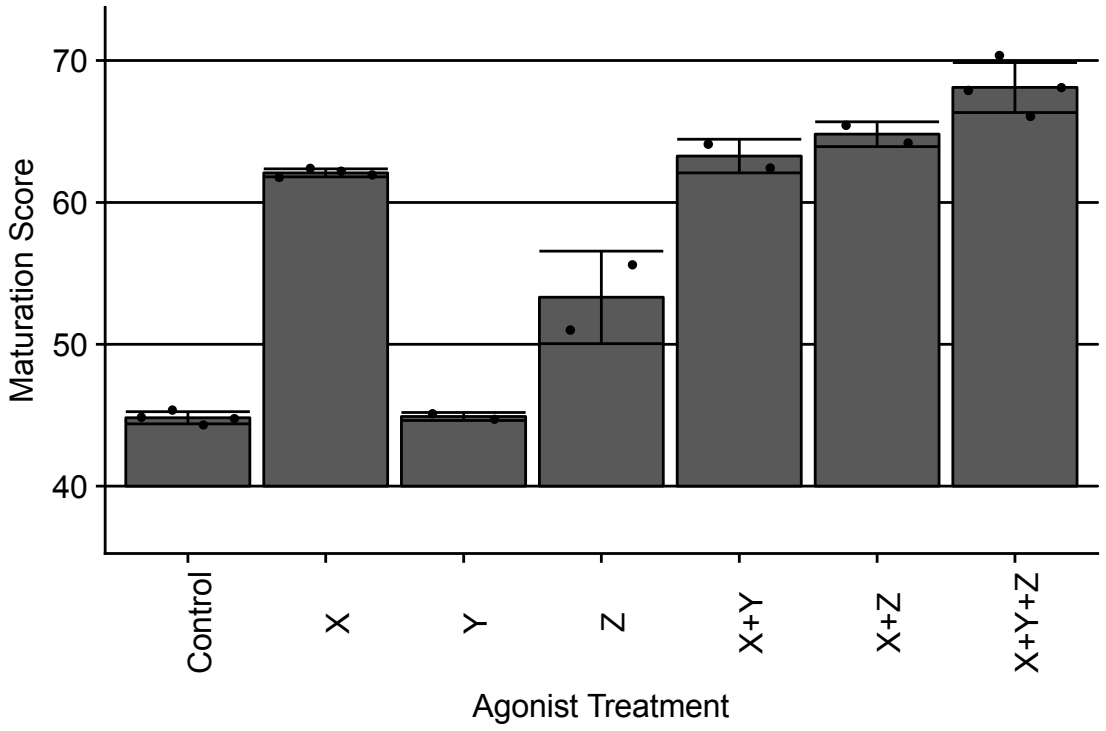
132　心筋細胞の成熟を促進する外因性シグナル	魚崎　英毅

【目的】この 10 年ほどで胚性幹（ES）細胞や人工多能性幹（iPS）細胞などの多能性幹細胞（PSCs）から心筋細胞を効率よく誘導する手法が開発され、患者由来のヒト iPS 細胞を用いた心臓疾患研究が現実のものとなりつつある。しかしながら、このような PSCs から試験管内で作製される心筋細胞（PSC-CMs）は未成熟であり、胎生期相当より試験管内では成熟しないことが明らかになってきた（Uosaki、Cell Rep、2015）。そのため、成人になってから発症する心疾患の試験管内での疾患研究は未だ困難であると言える。我々は PSC-CMs を新生仔の心臓内に移植することで、成体相当まで成熟可能であることを示した（Cho、Cell Rep、2017）。この結果から、PSC-CMs の内在的な転写プログラムが破綻しているのではなく、心臓組織にある細胞外微小環境やホルモンなどの液性因子といった外因性のシグナルの欠如が試験管内で PSC-CMs が成熟しない原因であると考えられた。そこで、本研究では新しい心筋細胞成熟レポーターと定量的成熟度評価系を用いて外因性シグナル、特に核内受容体アゴニストおよび細胞外マトリックスについて PSC-CMs に対する成熟促進効果について評価を行った。

【方法】我々はこれまでの研究で、アゴニスト既知の核内受容体 20 種類が心筋細胞成熟過程で活性化している可能性を見出した。また、心筋細胞が成熟する時期特異的に発現する細胞外マトリックスを同定した。そこで本研究では、これら核内受容体アゴニストおよび細胞外マトリックスが実際に心筋細胞の成熟を促進するかを検証した。検証には、トランスクリプトームにより心筋細胞の成熟度を定量的に評価する手法を用いた。

【結果】核内受容体アゴニスト X、Y、Z（知財上の観点からアゴニスト名は未公表）の組み合わせにより心筋細胞の成熟を促進することを見出した。一方、細胞外マトリックスではレポーター発現の増加や細胞形態の変化は認められたものの、トランスクリプトームとして評価できる成熟は見られなかった。

核内受容体アゴニスト処理による心筋細胞の成熟



132. 心筋細胞の成熟を促進する外因性シグナル

魚崎　英毅

自治医科大学 分子病態治療研究センター 再生医学研究部

Key words：心筋細胞，成熟，トランスクリプトーム，細胞外マトリックス，核内受容体

緒　言

胚性幹（ES）細胞や人工多能性幹（iPS）細胞などの多能性幹細胞（PSCs）は、様々な体細胞へと分化する能力を有する。そのため、再生医療、疾患研究、創薬への応用が強く期待されている。特に最近では、心筋細胞への分化誘導法が確立されたことをうけ、実際に患者から得ることが難しい心筋細胞を、患者由来の iPS 細胞から得ることで、心疾患研究へと応用する機運が高まっている。しかしながら、このような PSCs から試験管内で作製される心筋細胞（PSC-CMs）は未成熟であり、胎生後期ないし新生児期相当であることが明らかになってきた［1］。心筋細胞は生後に成熟が進み、その機能や形態が確立することが知られている。また、未熟な PSC-CMs では、成人で発症する心疾患の表現型を全て得ることは困難である。そのため、PSC-CMs の成熟を目指した研究が盛んに進められている。我々は PSC-CMs を新生仔の心臓内に移植することで、成体相当まで成熟可能であることを示した［2］。この結果から、PSC-CMs の内在的な転写プログラムが破綻しているのではなく、心臓組織にある細胞外微小環境やホルモンなどの液性因子といった外因性のシグナルの欠如が試験管内で PSC-CMs が成熟しない原因であると考えた。そこで、本研究では新しい定量的成熟度評価系を用いて外因性シグナル、特に細胞外マトリックスおよびホルモンを含む核内受容体アゴニストについて PSC-CMs に対する成熟促進効果について評価を行った。

方　法

1.　マウス ES 細胞の培養と分化誘導

Ncx プロモーター下に Puromycin 耐性遺伝子を発現するトランスジェニックマウス ES 細胞（syNP4）は LIF、CHIR00021、PD0325901 および血清存在下で未分化維持培養を行い、既報の通り分化誘導を行った［1，3］。分化 7 日目頃より拍動する心筋細胞が観察され、Puromycin を添加することにより、心筋細胞へと分化しなかった細胞を死滅させ、純度の高い心筋細胞を得た。

2. RNA サンプルの調製と RNA-sequence

マウスの心臓を胎生 11 日～生後 56 日から摘出し、心房および心室に分離し、RNA を得た。また、PSC-CMs は、分化 10 日目のものを細胞外マトリックス上に播種し、1～2 週後のものを細胞外マトリックス処理サンプルとした。同様に、分化 10 日目のものを 0.1% Gelatin 上に播種し、分化 14 日目からホルモンアゴニスト処理を行い、2 週後にサンプルを得た。RNA-seq は LEXOGEN QUANT-seq 3'mRNA-Seq Library Prep Kit を用いて、ライブラリーを作製し、Illumina Next-seq high output 75SE を用いて、心臓サンプルを 48 サンプルずつ、PSC-CMs は 96 サンプルずつシーケンスを行った。

3. 定量的成熟度評価法

RNA-seq で得られたサンプルごとの Fastq ファイルは、BBtools の BBDuk を用いたトリミング後に、STAR RNA-seq aligner を用いて、マウスゲノム（GRC mm10）へとマッピングを行った。featureCounts を用いてそれぞれの遺伝子ごとのカウントデータを得た。カウントデータは更に統計解析ソフトである R を用いて解析を行った。解析では、遺伝子ごとのカウントを総カウント数で除した、Transcript per million（TPM）、あるいは 10 を底とする対数に変換した logTPM を用いた。成熟度スコアは心臓サンプルの主成分分析から係数を算出し、一定のオフセットを加え、係数を掛けることで算出した。

結　果

1. 定量的成熟度評価法の開発

マウスの心臓を心房と心室に分け、胎生 11 日（E11）から生後 56 日目（P56）まで、各 6 サンプルずつ 8 タイムポイントで RNA-seq を行った。主成分分析の結果を図 1a に示す。PC1 軸方法に E11 から P56 にかけて整列していることから、この軸が心臓の成熟を反映していることを示唆している。一方、PC2 軸は心房と心室を分けている。興味深いことに心房、心室ともに P1 から P7 にかけては PC1 軸方向の変化は僅かであり、この時期は細胞の性質があまり変化していないことを示唆している。心筋細胞の成熟を定量的に評価する目的で、PC1 を元にした成熟度スコアを算出した（図 1b）。E11 から P56 の間でほぼ 0〜90 まで直線的に変化するスコアが得られた。また、新たに実施した P10 は P7 と P14 の間に来ることから、この手法の再現性、正確性の高さが裏付けられた。続いて、PSC-CMs を分化誘導し、純化した心筋細胞が得られる d10 およびそこから 1〜4 週間培養したサンプル（d17〜d38）について同様の解析を行った。成熟度スコアは d10 から d17 にかけて急激に増加したが、その後の増加は鈍化し、d24 で P1 程度、d38 でも P7 程度の成熟度となった。

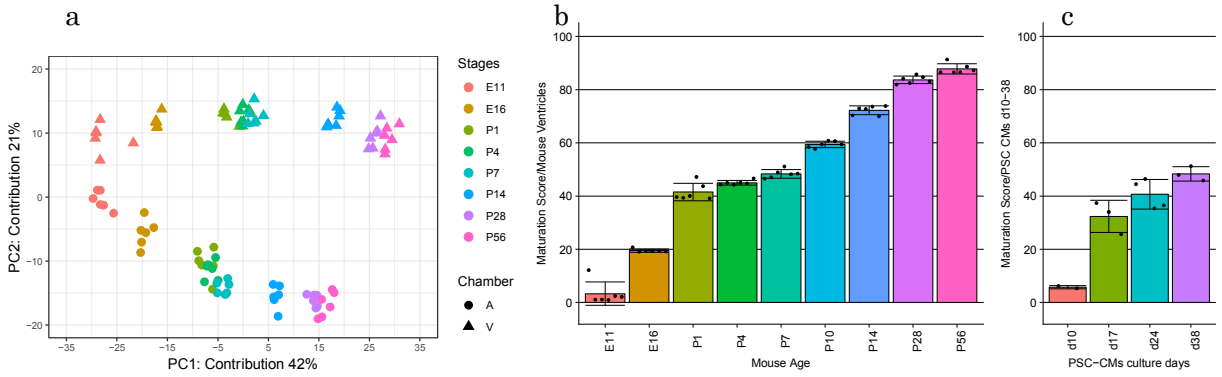


図 1. 心筋細胞成熟度の定量的評価法の開発

a）主成分分析結果 ●心房▲心室、E11 から P56 まで図に示す色により着色

b）第一主成分（PC1）より算出した成熟度スコア

c）PSC-CMs の成熟度スコア

2. 細胞外マトリックスの心筋細胞成熟に対する影響

上記、RNA-seqのデータを解析したところ、コラーゲンやラミニンなどの細胞外マトリックス（ECM）が、成熟段階特異的に発現していることを見出した。そこで、これらECMが心筋細胞の成熟に与える影響を検討した。PSC-CMsを各種ECM 1 μg/cm²でコーティングしたディッシュ上に播種し、1〜2週間後にRNA-seqを行い、その成熟度を評価した。外観上はPSC-CMsは肥大し、成熟していると考えられたが、成熟度スコアはコントロール（0.1 % Gelatin）と違いがなく、成熟に与える影響は限定的であると考えられた。

3. 核内受容体アゴニストの心筋細胞成熟に対する影響

我々は以前の研究において、様々な核内受容体が成熟する時期に活性化していることを見出した［1］。そこで、これら核内受容体に対するアゴニスト20種類について心筋細胞成熟に対する効果を検討した。PSC-CMsをそれぞれのアゴニストで2週間処理した後、RNA-seqを行い、その成熟度を評価した。これらのうちアゴニストXが最も効果が強かった。ついでXに加えて、残り19種類の追加効果を検討し、アゴニストYとZを見出した。さらにX＋Y、X＋Zに残り18種類のアゴニストの追加効果を検討したが、アゴニストX、Y、Zの組み合わせが最大の効果を発揮した（図2；アゴニスト名については知財上の観点から非開示)。

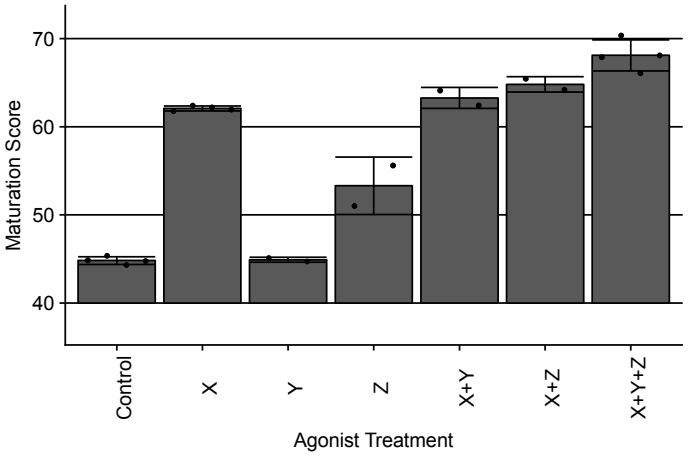


図 2. 核内受容体アゴニストの効果

PSC-CMs に対する核内受容体アゴニストの効果を定量的心筋細胞成熟度評価法により解析した。
なお、成熟度スコア 70 で概ね P14 相当である。

考　察

本研究で、新しい定量的心筋細胞成熟度評価法を確立した。トランスクリプトームを用いた成熟度評価は我々自身がこれまでに報告したマイクロアレイ法がある［1］。マイクロアレイ法はパブリックドメインに登録されたデータセットを用いており、新生仔と成体の間のデータセットがなかった。また、ヒトに応用することができないといった問題点があった。本研究で開発した新しい手法では、新規データセットを心筋細胞の成熟が見られる時期にフォーカスして得た。これにより、今までにない精度で心筋細胞の成熟を評価することが可能になった。本報告書では触れないが、この評価法をヒトへと応用する予備データを得ている。

これまで PSC-CMs の成熟に関する研究は生理学的な実験手法で解析される［4, 5］など、どの程度の成熟が得られているかという観点での情報が欠けていた。また、一定程度の成熟が見られる場合には、どの条件が優れているかなどを評価することが困難であった。例えば、本研究で言えばコントロールとアゴニスト X、アゴニスト X と X+Y+Z であれば、生理学的な実験手法でも差が見える可能性はあるが、X と X+Y や X+Z の差を見ることが困難である。結果的に、アゴニスト 3 剤の組み合わせを同定することはできないと考えられる。さらに、細胞が大きくなったことを、成熟の傍証としている研究もあるが、上述したように、細胞が大きくなったからといって必ずしも成熟が進んでいるとは言えないことが明らかになった。

本研究では、アゴニスト 3 剤の組み合わせにより、PSC-CMs を P14 相当まで成熟させることに成功した。培養期間が 28 日であることから、ほぼ生体内で P14 まで成熟するためにかかる時間と同等である。この結果は、少なくとも P14 相当まで成熟させるためにはアゴニスト 3 剤（あるいはその標的である核内受容体の活性化）で十分であることを示している。PSC-CMs を成体相当まで成熟させるために、単純に培養期間を延長させることで十分であるのか、それとも追加の因子が必要となるのか不明であり、今後の研究課題である。また、ヒトの心筋細胞の成熟は体内では年単位の時間がかかるが、これらアゴニストを加えることで短時間で成熟するのか、それとも同様の時間が必要となるのかについても検討の余地が残る。

共同研究者・謝辞

本研究の中心となったのは、自治医科大学分子病態治療研究センター再生医学研究部の大学院生である Nawin Chanthra である。また、日々のディスカッションなど同研究部の花園教授をはじめ同僚たちに感謝する。

文　献

1） Uosaki H, Cahan P, Lee DI, Wang S, Miyamoto M, Fernandez L, Kass DA, Kwon C. Transcriptional Landscape of Cardiomyocyte Maturation. Cell Rep. 2015 Nov 24;13(8):1705-16. doi: 10.1016/j.celrep.2015.10.032.

2） Cho GS, Lee DI, Tampakakis E, Murphy S, Andersen P, Uosaki H, Chelko S, Chakir K, Hong I, Seo K, Chen HV, Chen X, Basso C, Houser SR, Tomaselli GF, O'Rourke B, Judge DP, Kass DA, Kwon C. Neonatal Transplantation Confers Maturation of PSC-Derived Cardiomyocytes Conducive to Modeling Cardiomyopathy. Cell Rep. 2017 Jan 10;18(2):571-582. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.040.

3） Yamanaka S, Zahanich I, Wersto RP, Boheler KR. Enhanced proliferation of monolayer cultures of embryonic stem (ES) cell-derived cardiomyocytes following acute loss of retinoblastoma. PLoS One. 2008;3(12):e3896. doi: 10.1371/journal.pone.0003896.

4） Yang X, Pabon L, Murry CE. Engineering adolescence: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Circ Res. 2014 Jan 31;114(3):511-23. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.300558

5） Yang X, Rodriguez M, Pabon L, Fischer KA, Reinecke H, Regnier M, Sniadecki NJ, Ruohola-Baker H, Murry CE. Tri-iodo-l-thyronine promotes the maturation of human cardiomyocytes-derived from induced pluripotent stem cells. J Mol Cell Cardiol. 2014 Jul;72:296-304. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.04.005.