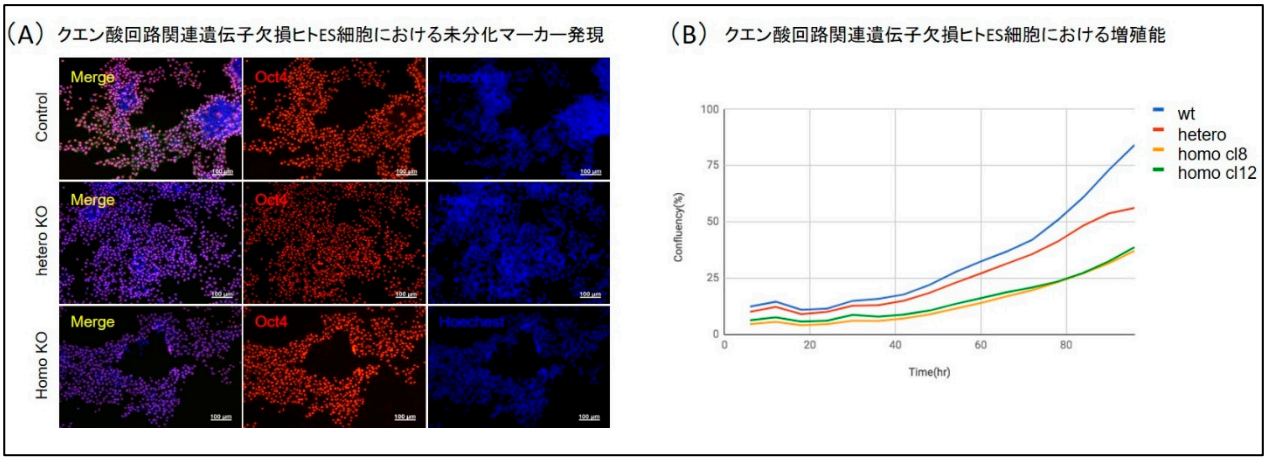
198　多能性幹細胞と心筋細胞におけるクエン酸回路の役割	遠山　周吾

【目的】ヒト多能性幹細胞は心筋細胞を含むあらゆる細胞へ分化することができるため、再生医療のみにならず創薬スクリーニングへの応用も期待されている。再生医療や創薬スクリーニングに利用するための細胞を効率よく作製するには、ヒト多能性幹細胞および分化誘導過程における細胞の代謝を理解することが極めて重要である。我々らの報告により、分化細胞だけでなくヒト多能性幹細胞においてもクエン酸回路を利用していることが明らかとなった。そこで、本研究ではヒト多能性幹細胞におけるクエン酸回路の役割を解析すると同時に、心筋細胞への分化誘導および心筋細胞の成熟化におけるクエン酸回路の役割を明らかにし、最終的に心筋分化能の高いヒト多能性幹細胞の選別や成熟心筋細胞の作製に応用することを目的としている。

【方法】1. ヒト多能性幹細胞におけるクエン酸回路の代謝酵素を CRISPR/Cas9 システムによりノックアウトした細胞株を作製する。2. クエン酸回路関連遺伝子欠損ヒト多能性幹細胞における未分化性および増殖能の評価を行う。3. クエン酸回路関連遺伝子欠損ヒト多能性幹細胞における心筋分化能の評価を行う。

【結果】ヒト多能性幹細胞におけるクエン酸回路の代謝酵素を CRISPR/Cas9 システムによりノックアウトした細胞株を作製した。クエン酸回路関連遺伝子欠損ヒト ES 細胞において、未分化マーカー発現は維持されていたが、増殖能はコントロール（クエン酸回路関連遺伝子発現株）に比べて低下傾向であった。また心筋細胞への分化誘導を行ったところ、心筋細胞への分化が可能であった。分化誘導効率に関しては大きな差を認めなかったものの、作製された心筋細胞における形態異常が認められた。

クエン酸回路関連遺伝子欠損ヒト ES 細胞における未分化マーカー発現と増殖能



198. 多能性幹細胞と心筋細胞におけるクエン酸回路の役割

遠山　周吾

慶應義塾大学 医学部 循環器内科

Key words：ヒト多能性幹細胞，心筋細胞，代謝，クエン酸回路，分化

緒　言

ヒト多能性幹細胞は心筋細胞を含むあらゆる細胞へ分化することができるため、再生医療のみにならず創薬スクリーニングへの応用も期待されている。再生医療や創薬スクリーニングに利用するための細胞を効率よく作製するには、ヒト多能性幹細胞および分化誘導過程における細胞の代謝を理解することが極めて重要である。我々は分化細胞だけでなく多能性幹細胞においてもクエン酸回路および電子伝達系が利用されていることを示してきたが［1］、その役割は明らかではない。本研究では、多能性幹細胞におけるクエン酸回路の代謝酵素をノックアウトすることにより、多能性幹細胞および心筋細胞におけるクエン酸回路の役割を解析し、心筋分化能の高い多能性幹細胞の選別や成熟心筋細胞の作製に応用することを目的としている。

方　法

1.　クエン酸回路関連関連遺伝子欠損ヒト多能性幹細胞株の作製

ヒト多能性幹細胞において、クエン酸回路の代謝酵素を CRISPR/Cas9 システムによりノックアウトした細胞株を作製する。クエン酸回路の代謝酵素タンパクが欠損していることを代謝酵素に対する抗体を用いて免疫染色および Western blot により評価する。

2.　クエン酸回路関連関連遺伝子欠損ヒト多能性幹細胞株における多能性維持

クエン酸回路関連遺伝子欠損ヒト多能性幹細胞における未分化マーカー（OCT4 等）の発現を免疫染色および flow cytometry により確認し、さらにクエン酸回路関連遺伝子欠損ヒト多能性幹細胞における増殖能を Incucyte Zoom を用いて評価する。

3.　クエン酸回路関連遺伝子欠損ヒト多能性幹細胞における心筋分化能の評価

クエン酸回路関連遺伝子欠損ヒト多能性幹細胞において、GSK3β阻害剤および Wnt 阻害剤処理により心筋細胞への分化誘導を行い[1, 2]、分化誘導効率を flow cytometry および免疫染色により評価する。心筋細胞は cardiac Troponin T 陽性細胞と定義する。

結　果

1.　クエン酸回路関連関連遺伝子欠損ヒト多能性幹細胞株の作製

ヒト多能性幹細胞において、クエン酸回路の代謝酵素を CRISPR/Cas9 システムによりノックアウトした細胞株を作製した。実際にノックアウトされていることを Western Blot により確認した。Hetero KO 株と Homo KO 株を用いてさらなる評価を行った。

2.　クエン酸回路関連関連遺伝子欠損ヒト多能性幹細胞株における多能性維持

クエン酸回路関連遺伝子欠損ヒト多能性幹細胞において未分化マーカーを発現しているか否かを免疫染色により評価したところ、Hetero KO 株と Homo KO 株のいずれも OCT4 を発現していた（図 1A)。さらに増殖能を Incucyte Zoom を用いて評価したところ、コントロールに比べ、Hetero KO 株と Homo KO 株ではやや低下傾向にあった（図 1B)。

3.　クエン酸回路関連遺伝子欠損ヒト多能性幹細胞における心筋分化能の評価

クエン酸回路関連遺伝子欠損ヒト多能性幹細胞において、GSK3β阻害剤および Wnt 阻害剤処理により心筋細胞への分化誘導を行い［1，2]、分化誘導効率を flow cytometry により評価したところ、明らかな分化誘導効率の低下を認めなかった（図 2)。一方で、作製された心筋細胞における形態異常が認められ、収縮能や成熟化の問題がないか今後評価を行う。

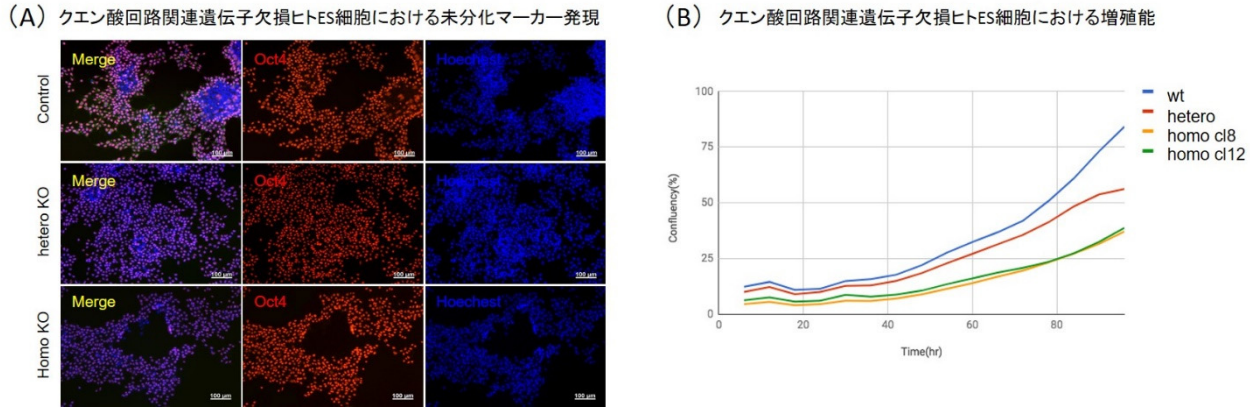


図 1.　クエン酸回路関連遺伝子欠損ヒト ES 細胞における未分化マーカー発現と増殖能

A）クエン酸回路関連遺伝子欠損ヒト ES 細胞における未分化マーカー発現

B）クエン酸回路関連遺伝子欠損ヒト ES 細胞における増殖能

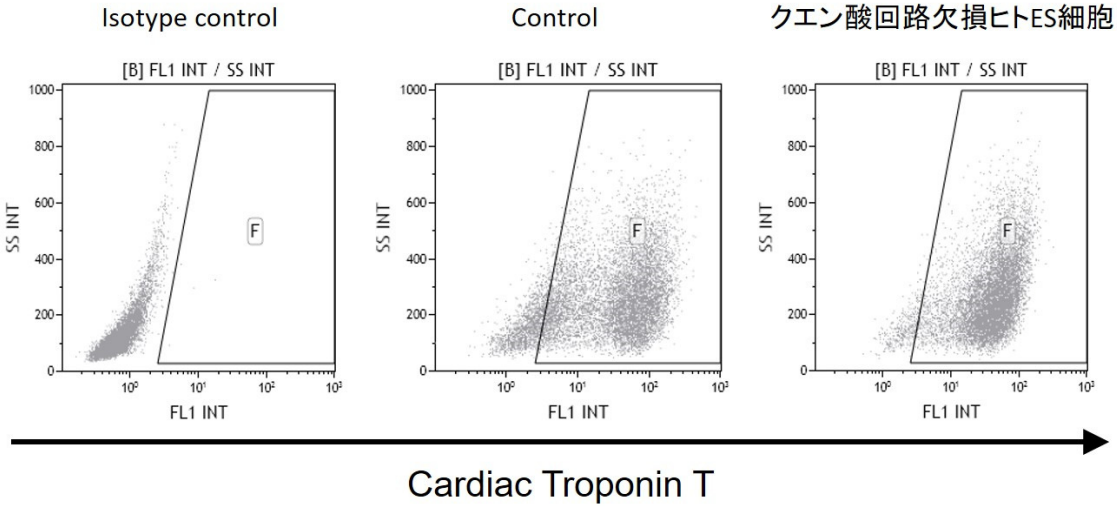


図 2.　クエン酸回路関連遺伝子欠損ヒト ES 細胞における心筋分化能

クエン酸回路関連遺伝子欠損ヒト ES 細胞を用いて心筋分化誘導を行ったところ、明らかな分化誘導効率の低下は認めなかった。

考　察

我々はこれまでに分化細胞だけでなくヒト多能性幹細胞においてもクエン酸回路を利用していることを報告している［1］。本研究では、ヒト多能性幹細胞において特定のクエン酸回路関連遺伝子をノックアウトしたが、未分化マーカーには有意な変動を認めなかった。一方で、増殖に関しては、クエン酸回路関連遺伝子欠損ヒト多能性幹細胞において低下する傾向があり、ヒト多能性幹細胞においてクエン酸回路は増殖に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、我々はヒト多能性幹細胞から心筋分化誘導過程においてクエン酸回路酵素遺伝子の発現が著明に上昇することを報告しているが［1］、心筋分化誘導効率には影響を及ぼさなかった。一方で、作製された心筋細胞における形態異常が認められ、収縮能や成熟化の問題がないか今後評価を行っていく予定である。

文　献

1） Tohyama S, Fujita J, Hishiki T, Matsuura T, Hattori F, Ohno R, Kanazawa H, Seki T, Nakajima K, Kishino Y, Okada M, Hirano A, Kuroda T, Yasuda S, Sato Y, Yuasa S, Sano M, Suematsu M, Fukuda K. Glutamine Oxidation is Indispensable for Survival of Human Pluripotent Stem Cells. Cell Metab. 2016 Apr 12;23(4):663-74. doi: 10.1016/j.cmet.2016.03.001.

2） Tohyama S, Fujita J, Fujita C, Yamauchi M, Kanaami S, Ohno R, Sakamoto K, Kodama M, Kurokawa J, Kanazawa H, Seki T, Kishino Y, Okada M, Nakajima K, Tanosaki S, Someya S, Hirano A, Kawaguchi S, Kobayashi E, Fukuda K. Efficient Large-Scale 2D Culture System for Human Induced Pluripotent Stem Cells and Differentiated Cardiomyocytes. Stem Cell Reports. 2017 Nov 14;9(5):1406-1414. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.08.025.