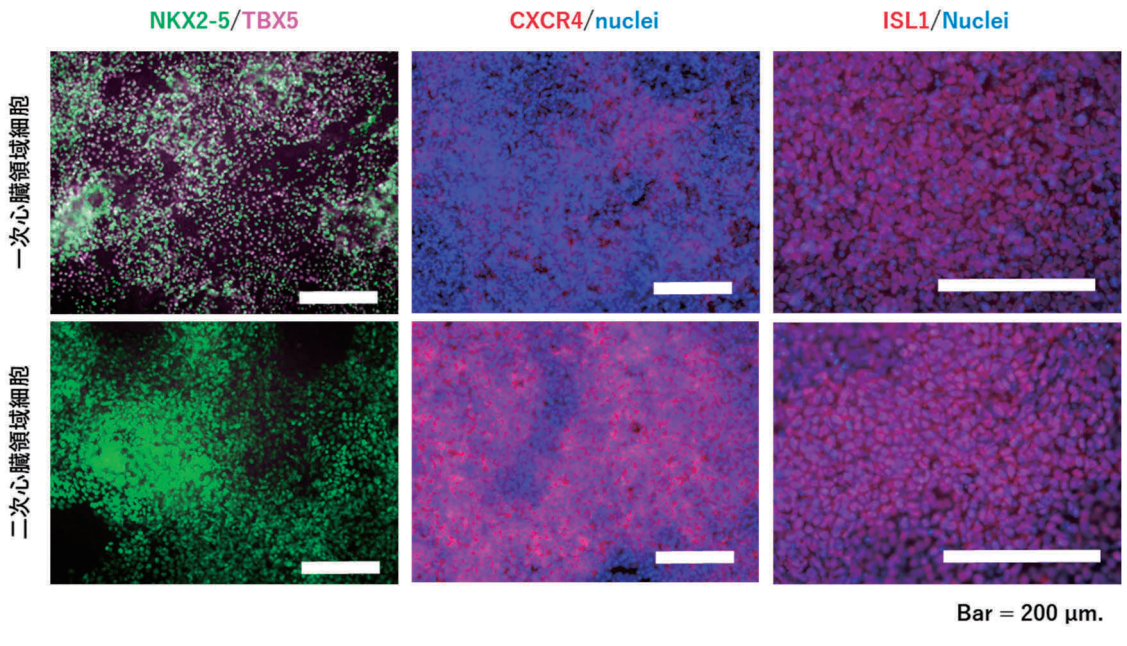
169　iPS細胞由来心臓予定領域細胞移植による心不全治療	斎藤　幸弘

【目的】心筋細胞に効率よく分化するヒト ES／iPS 細胞由来心臓前駆細胞は、心不全治療のツールとして期待される。胎生期に心臓前駆細胞によって形成される心臓予定領域に、一次心臓領域と二次心臓領域がある。一次心臓領域細胞が原始心臓構造を形成し、その後、二次心臓領域細胞が原始心臓構造に向かって遊走し、心臓の　伸長に寄与する。一般的に、二次心臓領域細胞は、増殖能および遊走能が高い前駆細胞であることが知られており、移植による心不全抑制効果が期待される。そこで、移植細胞のソースとして、ヒト iPS 細胞から一次心臓領域細胞および二次心臓領域細胞の誘導を試みた。加えて、異なる種類の細胞移植の生着を、非侵襲的に定量比較できるシステムの準備を行った。

【方法】Lian たちが報告した GSK3 阻害剤と Wnt 阻害剤を用いた心筋細胞分化誘導法である GiWi プロトコール（Proc Natl Acad Sci U S A. 2012）をベースとした心筋分化誘導法を用いて、ヒト iPS 細胞から一次心臓領域と二次心臓領域を誘導した。そしてこれらの心臓予定領域細胞に含まれる未分化細胞を Brequinar 添加によって除去した。また、移植後の生着を非侵襲的に定量的に評価するために、核医学イメージングで検出可能な機能付加ヒト iPS 細胞株を作製した。

【結果】GiWi プロトコールでは、一次心臓領域細胞に相当する $NKX2\text{-}5^{+}/TBX5^{+}$心筋前駆細胞が主に誘導されることがわかった。次に、GSK3 阻害剤にインスリンあるいは BMP 阻害剤を添加すると、二次心臓領域細胞に相当する $NKX2\text{-}5^{+}/TBX5^{-}$心筋前駆細胞が主に誘導された。複数のヒト iPS 細胞株でこの方法の再現性を確認した。誘導された一次心臓領域細胞には、未分化マーカーである $NANOG^{+}$細胞の混入を認めなかったが、二次心臓領域細胞には、$NANOG^{+}$細胞の混入を認めた。そこで Al-Akashi らが iPS 細胞由来間葉系幹細胞から未分化細胞を除去するのに使用した Brequinar（Front Cell Dev Biol. 2023）を添加することで $NANOG^{+}$細胞を除去できることがわかった。移植後の細胞生着を SPECT で定量的に経時的に評価するために、ナトリウム・ヨード共輸送体を恒常的に発現するヒト iPS 細胞を作製した。この共輸送体によって、細胞が ^{125}I、^{18}F-tetrafluoroborate、$^{99m}TcO_4^{-}$といった放射性トレーサを取り込むことができ、SPECT で検出することができた。今後はこの細胞株を用いて一次心臓領域細胞および二次心臓領域細胞を誘導し、心不全モデルラットに移植する予定である。

ヒト iPS 細胞由来一次心臓領域細胞および二次心臓領域細胞



169. iPS 細胞由来心臓予定領域細胞移植による心不全治療

斎藤　幸弘

岡山大学病院 循環器内科

Key words：ヒト iPS 細胞，心臓前駆細胞，移植細胞の *in vivo* イメージング

緒　言

高齢化とともに心不全患者数は増加の一途をたどっている。これまでにも様々な心不全に対する治療が発展し、心不全患者の予後を改善しているが、心不全における心筋細胞の脱落を補充する方法は確立されていない。そのため、多能性幹細胞由来細胞の移植による心筋細胞補充療法が期待されている。現在行われている臨床試験では、補充する細胞のソースとしてヒト iPS 細胞由来心筋細胞が用いられている。一方、心筋細胞に効率よく分化するヒト ES／iPS 細胞由来心臓前駆細胞も、細胞治療のソースとして期待されるものの、心筋細胞ほど研究は進んでいない。まず、心臓前駆細胞といってもいくつかの種類に分けられる。その分類方法の一つとして、一次心臓領域と二次心臓領域がある。一次心臓領域細胞が原始心臓構造を形成し、その後、二次心臓領域細胞が原始心臓構造に向かって遊走し、心臓の伸長に寄与する。一次心臓領域とは、すでにサルコメア遺伝子を発現している心筋細胞になることが決定している状態の細胞である。一方、二次心臓領域細胞は、心筋細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞への分化能を有し、一般的には増殖能および遊走能が高い前駆細胞であることが知られている。そのため、これらの異なる心臓前駆細胞の移植によって、異なる心不全抑制効果がみられる可能性がある。そこで、移植細胞のソースとして、ヒト iPS 細胞から一次心臓領域細胞および二次心臓領域細胞の誘導を試みた。加えて、異なる種類の細胞移植の生着を、非侵襲的に定量比較できるシステムの準備を行った。

方　法

1. ヒト iPS 細胞由来一次心臓領域細胞および二次心臓領域細胞の誘導

Lian らが報告した、GSK3 阻害剤で中胚葉を誘導し、次に Wnt 阻害剤を加えることで心臓前駆細胞および心筋細胞を誘導する分化誘導方法である GiWi プロトコール［1］をベースとし、ヒト iPS 細胞から心臓前駆細胞誘導を行った。

2. ヒト iPS 細胞由来心臓前駆細胞に混在する未分化細胞の除去

分化 5～6 日目の細胞には心臓前駆細胞に加えて未分化細胞が混在している可能性がある。未分化細胞の混在は、移植後にテラトーマを形成する可能性があるため、除去する必要がある。そこで、未分化細胞の除去に使用報告のある rBC2LCN-PE23［2］および Brequinar［3］を分化 3 日目から添加して検討を行った。

3. *In vivo* imaging による移植細胞の可視化

ナトリウム・ヨード共輸送体（NIS）は、甲状腺や胃に高発現してヨードを取り込むトランスポーターである。NIS は放射性トレーサである ^{125}I、^{18}F-tetrafluoroborate、$^{99m}TcO_4^-$を取り込むことができるため、取り込んだ細胞を核医学イメージングで検出することが可能である。サル iPS 細胞に NIS を導入し、移植した iPS 細胞を ^{18}F-tetrafluoroborate PET/CT で検出可能であることが報告されており［4］、有望である。一方、ヒト細胞での検討はなされていないことから、同様の方法をヒト iPS 細胞で検討した。具体的には、導入遺伝子のサイレン

シングを回避するために safe harbor である AAVS1 領域に CAG promoter-*SLC5A5*（NIS 遺伝子）-IRES-*EGFP* あるいは CAG promoter-IRES-*EGFP* を導入し、NIS 発現 iPS 細胞株とコントロール iPS 細胞株を作製した。さらにこれらのヒト iPS 細胞株から心筋細胞を誘導した。iPS 細胞あるいは iPS 細胞由来心筋細胞を免疫不全ラット（F344-*Il2rg/Rag2*^{em1Iexas}）［5］に移植し、$^{99m}TcO_4^-$-SPECT で検出した。

結　果

1. ヒト iPS 細胞由来一次心臓領域細胞および二次心臓領域細胞の誘導

標準的な GiWi プロトコールを用いると、分化 7 日目のほとんどの細胞が一次心臓領域のマーカーである TBX5 陽性であり、TBX5 陰性の二次心臓領域が誘導されていないことがわかった。次に、分化 0 日目に GSK3 阻害剤とともにインスリンを加えると、一次心臓領域のマーカーである TBX5、HCN4 の発現が低下し、二次心臓領域のマーカーである FGF10、CXCR4、ISL1 の発現が上昇することがわかった。インスリンは GSK3 阻害剤／Wnt 阻害剤を用いたプロトコールでは心筋細胞誘導をそれほど抑制しないが、BMP4／ActivinA を用いた心筋細胞誘導プロトコールで心筋細胞の誘導を完全に阻害することが報告されている［6］。そこで、Smad1/5 および Smad2/3 のリン酸化をウェスタンブロットで検討したところ、インスリンは Smad1/5 のリン酸化を抑制しており、インスリンが GSK3 阻害剤によって誘導される内因性 BMP シグナルを抑制していることが示唆された。次に、インスリンの代わりに BMP 阻害剤である Dorsomorphin あるいは DMH1 を GSK3 阻害剤とともに分化 0 日目に添加した。予想通り、心臓前駆細胞ステージである分化 6～7 日目に、一次心臓領域のマーカーである TBX5、HCN4 の発現が低下し、二次心臓領域のマーカーである FGF10、CXCR4、ISL1 の発現が上昇した（図 1）。さらに培養を継続すると、一次心臓領域細胞および二次心臓領域細胞のどちらからも心筋細胞が高効率に生じた。心室筋マーカーの MLC2v の発現を免疫染色で検討すると、一次心臓領域細胞由来心筋細胞は TBX5$^+$/MLC2v$^+$の左室様心筋細胞であり、二次心臓領域細胞由来心筋細胞は TBX5^{low}/MLC2v$^+$の右室様心筋細胞であることがわかった。

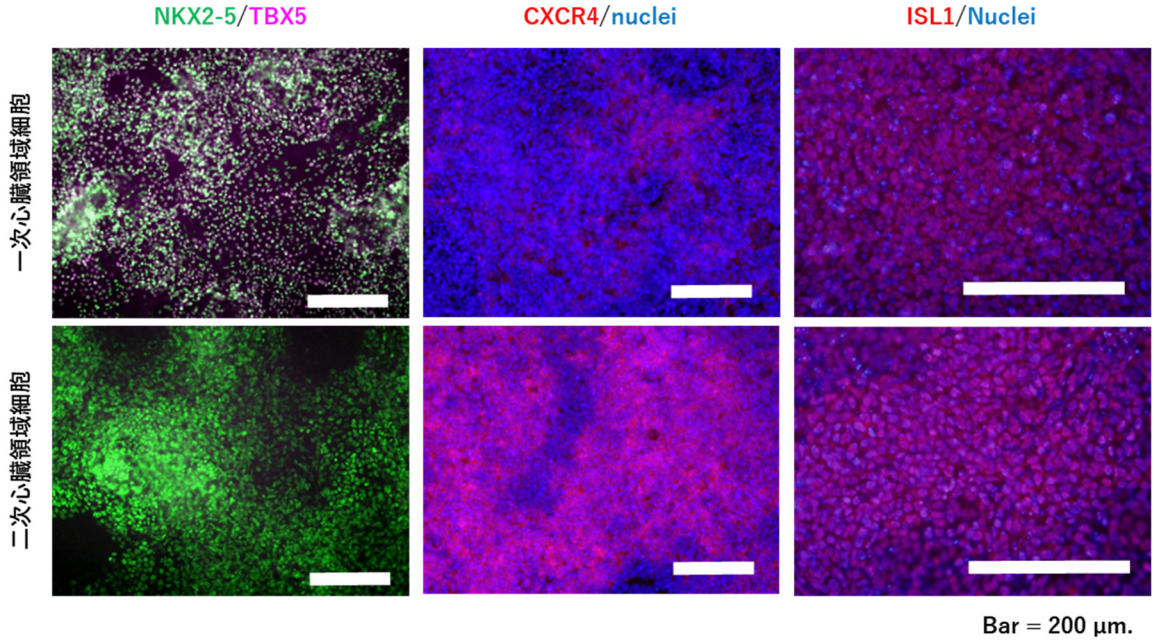


図 1.　ヒト iPS 細胞由来一次心臓領域細胞および二次心臓領域細胞の免疫染色像
左：分化 7 日目の細胞のおける NKX2-5（緑、心臓前駆細胞のマーカー）および TBX5（赤紫、一次心臓領域のマーカー）の発現の比較。
中：分化 6 日目の細胞における CXCR4（赤、二次心臓領域のマーカー）の発現の比較。
右：ISL1（赤、二次心臓領域での発現が高いとされる心臓前駆細胞のマーカー）。

2. ヒト iPS 細胞由来心臓前駆細胞に混在する未分化細胞の除去

分化 6 日目に未分化マーカーである NANOG を染色すると、一次心臓領域細胞では NANOG 陽性細胞がほとんどみられなかったが、二次心臓領域細胞では NANOG 陽性細胞の混在が認められた。そこで、rBC2LCN-PE23 あるいは Brequinar を分化 3 日目から添加して未分化細胞の除去を試みた。rBC2LCN-PE23 を用いると、未分化細胞だけでなくすべての細胞が死んでしまった。一方、Brequinar を用いると NANOG 陽性細胞数を減らすことができ（図 2）、生存した前駆細胞からは支障なく心筋細胞が生じた。しかしながら、3 日間では 100 nM から 1 μM の範囲内での Brequinar では未分化細胞を完全に除去することはできなかった。

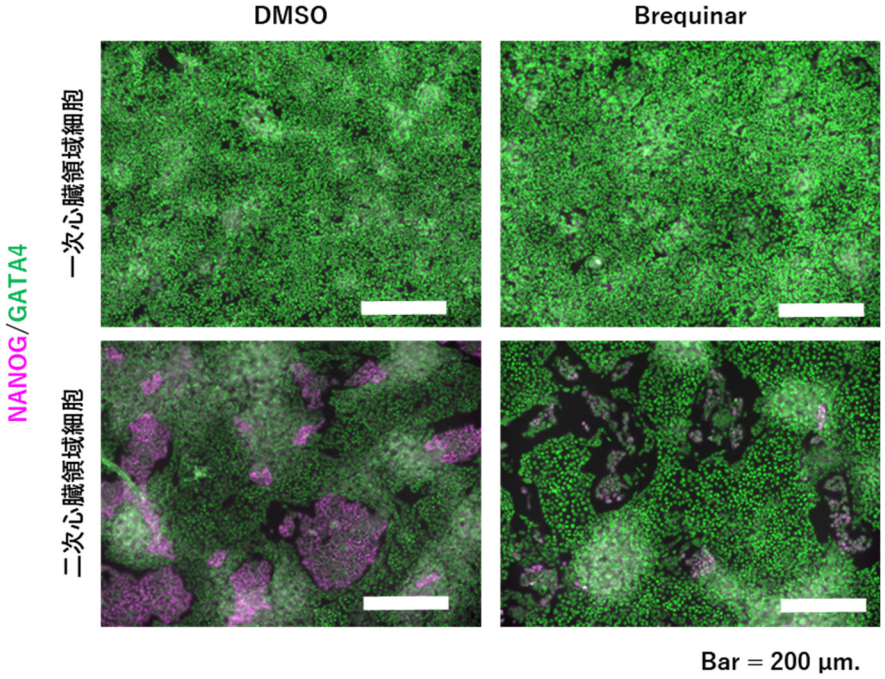


図 2. 心臓前駆細胞中の未分化細胞の混在と除去。
分化 6 日目の細胞のおける GATA4（緑、中胚葉のマーカー）および NANOG（赤紫、未分化マーカー）の発現の比較。

3. *In vivo* イメージングによる移植細胞の可視化

ヒト iPS 細胞に AAVS1 領域に対する TALEN を用いて NIS をコードする *SLC5A5* を導入した。両アレルに *SLC5A5* が挿入された細胞株を選択し、実験に使用した。NIS を発現させることで、ヒト iPS 細胞およびヒト iPS 細胞由来心筋細胞は、^{125}I、^{18}F-tetrafluoroborate の取り込み能を獲得したことを *in vitro* で確認した。さらに NIS 発現 iPS 細胞を免疫不全ラットに移植すると、テラトーマを形成し、テラトーマが$^{99m}TcO_4^-$を取り込むことを SPECT で確認した。興味深いことに、NIS 発現テラトーマは明らかにコントロール細胞由来テラトーマに比べてサイズが小さかった。そこで *in vitro* で、細胞増殖能を検討した。iPS 細胞維持用培地での培養では、高濃度（30 μM）のヨウ化ナトリウムを添加すると、NIS 発現 iPS 細胞の増殖が抑制されたが、生体内での血中濃度に相当するヨウ化ナトリウムの添加では影響はなかった。次に分化の際に用いる培養液で培養したところ、NIS 発現 iPS 細胞由来細胞の増殖は、コントロール iPS 細胞由来細胞に比べて顕著に低下した。さらに、培養心筋細胞においては NIS 発現心筋細胞とコントロール心筋細胞で 10 日間の培養後に細胞数の違いは認めなかったが、NIS 発現心筋細胞にヨウ化ナトリウムを添加すると、わずかではあるが優位に細胞数が増加することがわかった。最後に NIS 発現 iPS 細胞由来心筋細胞を、鼠径部皮下脂肪組織内に移植し、その生着と残存を$^{99m}TcO_4^-$ SPECT を用いて評価し、経時的に追跡可能であることを確認した（図 3）。

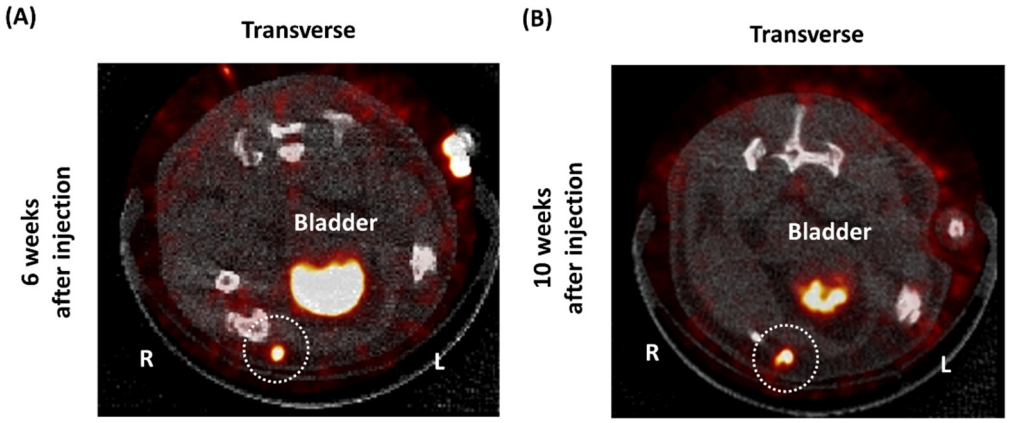


図 3. $^{99m}TcO_4^-$SPECT による右鼠径部皮下脂肪組織内に移植した NIS 発現心筋細胞検出
移植 6 週間後の SPECT 像（A）および移植 10 週間後の SPECT 像（B）。白色の破線で囲んだ部分に移植した細胞によるトレーサの取り込みが確認できる。

考　察

ヒト iPS 細胞から一次心臓領域前駆細胞と二次心臓領域前駆細胞を別々に誘導する方法を確立した。二次心臓領域細胞は、ケモカイン受容体である CXCR4 が高発現しており、損傷部位への遊走が期待できる。一方で、二次心臓領域細胞には未分化細胞が残存しており、移植前に除去する必要があることがわかった。薬剤処理による除去を試みたものの、完全に除去するには 1 週間かかるため、心臓前駆細胞の状態を過ぎて心筋細胞となってしまう。そのため、細胞表面マーカーによるソーティング、あるいは心臓前駆細胞の状態で維持増殖を現在試みている。また、移植細胞の生着・残存を客観的・定量的に評価する必要があり、NIS 発現ヒト iPS 細胞株を作製し、SPECT で異所性移植した心筋細胞を検出できることを確認した。今後、NIS 発現ヒト iPS 細胞株から誘導した異なる種類の心臓前駆細胞を心不全ラットに移植し、その効果を検討する予定である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者である、University of Wisconsin School of Medicine and Public Health の Timothy J. Kamp 教授、岡山大学学術研究院医歯薬学域分子イメージング学講座の能勢直子助教、樋口隆弘教授、岡山大学学術研究院医歯薬学域循環器内科学講座の中村一文准教授に感謝いたします。

文　献

1） Lian X, Hsiao C, Wilson G, Zhu K, Hazeltine LB, Azarin SM, Raval KK, Zhang J, Kamp TJ, Palecek SP. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jul 3;109(27):E1848-57. doi: 10.1073/pnas.1200250109. PMID: 22645348.

2） Tateno H, Onuma Y, Ito Y, Minoshima F, Saito S, Shimizu M, Aiki Y, Asashima M, Hirabayashi J. Elimination of tumorigenic human pluripotent stem cells by a recombinant lectin-toxin fusion protein. Stem Cell Reports. 2015 May 12;4(5):811-20. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.02.016. PMID: 25866158.

3) Al-Akashi Z, Zujur D, Kamiya D, Kato T Jr, Kondo T, Ikeya M. Selective vulnerability of human-induced pluripotent stem cells to dihydroorotate dehydrogenase inhibition during mesenchymal stem/stromal cell purification. Front Cell Dev Biol. 2023 Feb 6;11:1089945. doi: 10.3389/fcell.2023.1089945. PMID: 36814599.
4) Ostrominski JW, Yada RC, Sato N, Klein M, Blinova K, Patel D, Valadez R, Palisoc M, Pittaluga S, Peng KW, San H, Lin Y, Basuli F, Zhang X, Swenson RE, Haigney M, Choyke PL, Zou J, Boehm M, Hong SG, Dunbar CE. CRISPR/Cas9-mediated introduction of the sodium/iodide symporter gene enables noninvasive in vivo tracking of induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Stem Cells Transl Med. 2020 Oct;9(10):1203-1217. doi: 10.1002/sctm.20-0019. PMID: 32700830.
5) Miyasaka Y, Wang J, Hattori K, Yamauchi Y, Hoshi M, Yoshimi K, Ishida S, Mashimo T. A high-quality severe combined immunodeficiency (SCID) rat bioresource. PLoS One. 2022 Aug 12;17(8):e0272950. doi: 10.1371/journal.pone.0272950. PMID: 35960733.
6) Lian X, Zhang J, Zhu K, Kamp TJ, Palecek SP. Insulin inhibits cardiac mesoderm, not mesendoderm, formation during cardiac differentiation of human pluripotent stem cells and modulation of canonical Wnt signaling can rescue this inhibition. Stem Cells. 2013 Mar;31(3):447-57. doi: 10.1002/stem.1289. PMID: 23193013.