

iPS 細胞由来バイオペースメーカーの開発

信州大学医学部再生医科学教室
柴 祐司

【研究背景】

徐脈性不整脈に対する機械式ペースメーカーは有効な治療法であり、日本国内で年間約 59,000 件の植込み術が行われている。しかし、その医療コストは増大しており、大きな社会問題である。さらに機械式ペースメーカーは定期的な電池交換手術が必要であり、術後のペースメーカー感染という深刻な問題も増加している。そこで本研究では、機械式ペースメーカーに代わる新たな治療法として、多能性細胞を用いたバイオペースメーカーの開発を目指す。

多能性幹細胞から分化した心筋細胞には、心筋再生に必要な心室筋細胞だけでなくペースメーカー細胞が含まれていることが知られている (図 1、2)。これまで多能性幹細胞を用いた心筋再生治療の開発研究が活発に行われているが、心筋再生には大量の心室筋細胞を移植する必要があり、治療コストの観点から実用化の見通しが立っていない。成人の心臓に存在する約 40 億個の心筋細胞は、わずかに約 10000 個のペースメーカー細胞の自律拍動に応じて収縮と拡張を繰り返している。バイオペースメーカーは必要な移植細胞数が少なく、低コストで実現可能であり、徐脈性不整脈患者の生活の質を根本的に改善するとともに、医療費削減にも大きく貢献する。

従来から開発研究では、ペースメーカー細胞を同定する手段が限られており、ペースメーカー細胞を高効率に誘導するプロトコルが確立されていない。さらに、作製したペースメーカー細胞の有効性と安全性を適切に評価するための *in vivo* 移植モデルが確立されておらず、バイオペースメーカーの実用化に至っていない。そこで本研究では、心臓ペースメーカー細胞特異的遺伝子 SHOX2 (図 2) 発現により蛍光発色し薬剤耐性を示す多能性幹細胞株を作り (図 3)、ペースメーカー細胞誘導のスクリーニングシステムを樹立し、このシステムを用いてペースメーカー細胞誘導プロトコルを確立する。作製したペースメーカー細胞が実際に“バイオペースメーカー”として機能するかを確認するためには、小動物への異種移植実験では不十分である。そこで霊長類における同種細胞移植を行い、iPS 細胞由来バイオペースメーカー

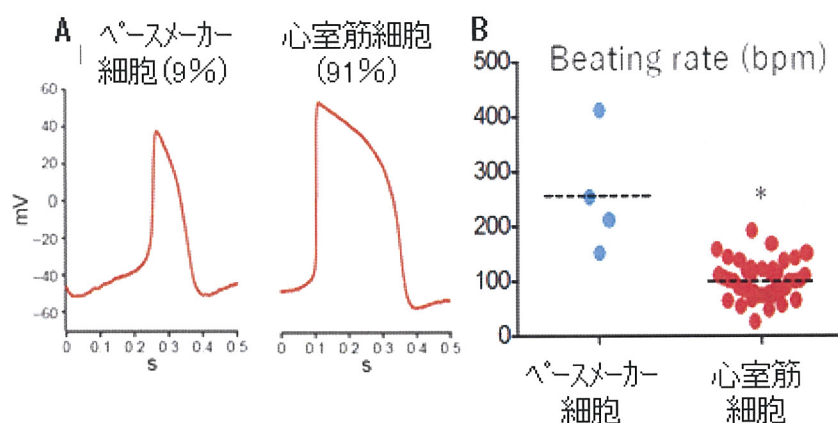


図 1. 多能性幹細胞由来心筋細胞のサブタイプ

A. パッチクランプ法によって活動電位を評価すると心筋細胞にはペースメーカー細胞と心室筋細胞が含まれていることが分かる。B. ペースメーカー細胞は非常に速い心拍数を示す。

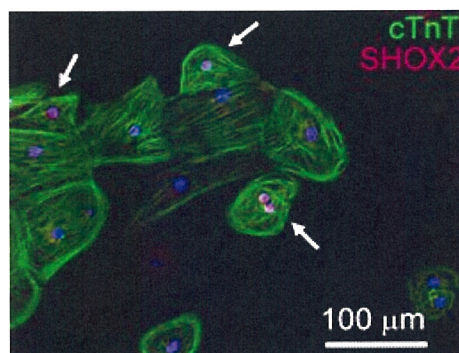


図 2. SHOX2⁺ペースメーカー細胞

多能性幹細胞から作製した心筋細胞は、心筋トロポニン T (cTnT; 緑) 陽性であり、さらにペースメーカー細胞は SHOX2 陽性 (赤) である。

の有効性と安全性を評価する。

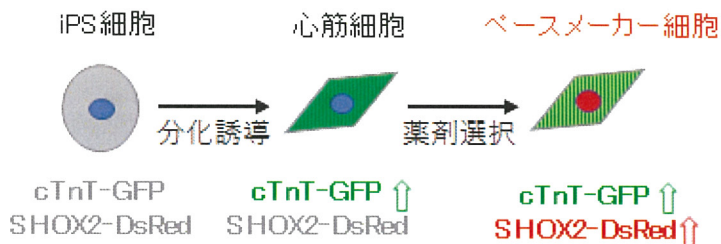


図3. β -スミーカー特異的蛍光蛋白発現細胞の樹立

iPS細胞のcTnT遺伝子下流にGFP、SHOX2遺伝子下流にDsRed遺伝子を導入する。この細胞から心筋細胞を作製すると、細胞質が緑色発色し、さらに β -スミーカー細胞では核が赤色発色する。

【研究方法および結果】

ヒト iPS 細胞から作製した心筋細胞には、約 9 割の心室筋細胞と約 1 割のペースメーカー細胞が混在している (図 1)。そこで、この心筋細胞をラット心臓に移植した場合にペースメーカー細胞が生着するか検討することとした。図 4 の如く、ヒト iPS 細胞から作製した心筋細胞 (心室筋+ペースメーカー細胞) を免疫不全ラットの心臓に移植し、2 週間後、4 週間後または 12 週間後に心臓を摘出し、組織学的検査によって、ペースメーカー細胞の生着を評価した。図 5 に移植後 2 週、4 週、12 週における HCN4、SHOX2、TBX3 のペースメーカーマーカーの発現を示す。移植されたペースメーカー細胞は 2-4 週間は生着しているものの、12 週間後には有意に生着が低下することが示された。この結果から、ペースメーカー細胞を含む心筋細胞移植は長期的にバイオペースメーカーとして機能しないことが示された。そこで、次に、iPS 細胞からペースメーカー細胞を特異的に分化・純化させることを目指した。図 3 の如く、ペースメーカー特異的転写因子である SHOX2 遺伝子下流に DsRed 遺伝子および薬剤耐性遺伝子を導入した。遺伝子導入細胞から心筋細胞を作製したが、DsRed の蛍光発色が同定できなかった。SHOX2 遺伝子下流に導入した DsRed 遺伝子の蛋白発現が同定できない原因について様々な検討を行った結果、心筋細胞において SHOX2 遺伝子発現が極めて低いことが原因であることが示唆された。そこで、ペースメーカーチャネルである HCN4 遺伝子下流に tdTomato 遺伝子を導入することとした (図 6)。遺伝子導入後の PCR 検査によって図 6 の如く、homologous に遺伝子導入された細胞株

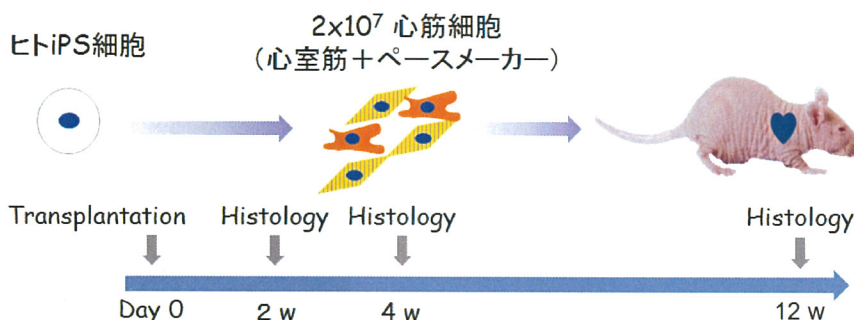


図4. *In vivo* 移植実験

臓に移植し、2 週間後、4 週間後または 12 週間後に心臓を摘出し、組織学的検査によって、ペースメーカー細胞の生着を評価した。図 5 に移植後 2 週、4 週、12 週における HCN4、SHOX2、TBX3 のペースメーカーマーカーの発現を示す。移植されたペースメーカー細胞は 2-4 週間は生着しているものの、12 週間後には有意に生着が低下することが示された。この結果から、ペースメーカー細胞を含む心筋細胞移植は長期的にバイオペースメーカーとして機能しないことが示された。そこで、次に、iPS 細胞からペースメーカー細胞を特異的に分化・純化させることを目指した。図 3 の如く、ペースメーカー特異的転写因子である SHOX2 遺伝子下流に DsRed 遺伝子および薬剤耐性遺伝子を導入した。遺伝子導入細胞から心筋細胞を作製したが、DsRed の蛍光発色が同定できなかった。SHOX2 遺伝子下流に導入した DsRed 遺伝子の蛋白発現が同定できない原因について様々な検討を行った結果、心筋細胞において SHOX2 遺伝子発現が極めて低いことが原因であることが示唆された。そこで、ペースメーカーチャネルである HCN4 遺伝子下流に tdTomato 遺伝子を導入することとした (図 6)。遺伝子導入後の PCR 検査によって図 6 の如く、homologous に遺伝子導入された細胞株

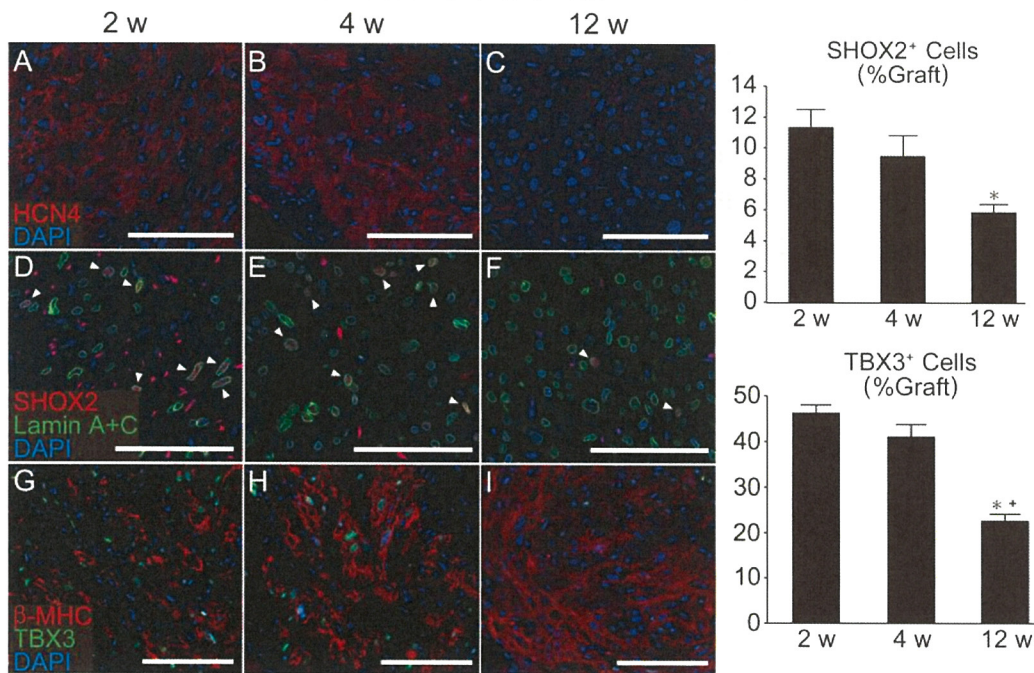
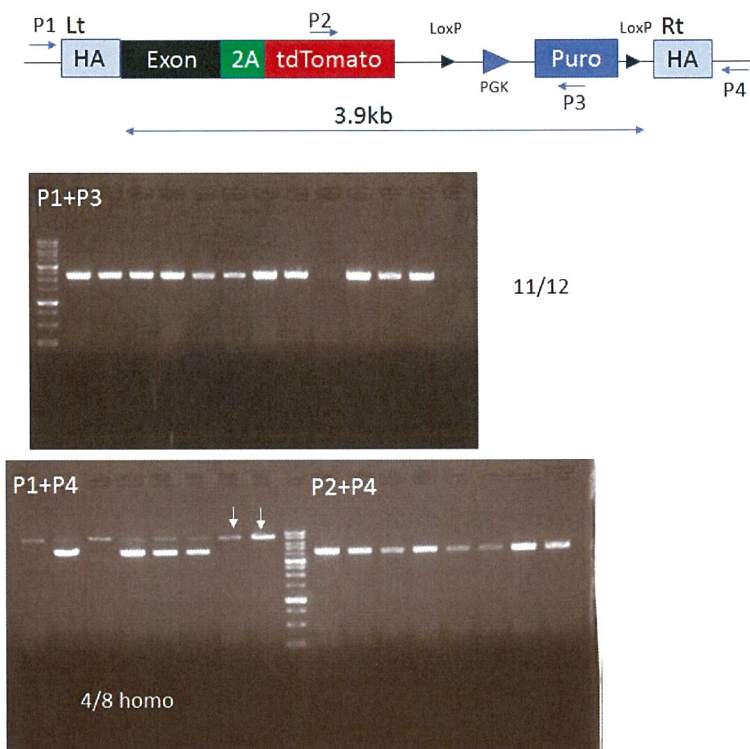


図5. 心筋細胞移植後のペースメーカー細胞分画の生着

ペースメーカー細胞を特異的に分化・純化させることを目指した。図 3 の如く、ペースメーカー特異的転写因子である SHOX2 遺伝子下流に DsRed 遺伝子および薬剤耐性遺伝子を導入した。遺伝子導入細胞から心筋細胞を作製したが、DsRed の蛍光発色が同定できなかった。SHOX2 遺伝子下流に導入した DsRed 遺伝子の蛋白発現が同定できない原因について様々な検討を行った結果、心筋細胞において SHOX2 遺伝子発現が極めて低いことが原因であることが示唆された。そこで、ペースメーカーチャネルである HCN4 遺伝子下流に tdTomato 遺伝子を導入することとした (図 6)。遺伝子導入後の PCR 検査によって図 6 の如く、homologous に遺伝子導入された細胞株

が 4 株得られた。現在 tdTomato 遺伝子導入 iPS 細胞株から、心筋細胞を作製中であり、心筋細胞作製後、tdTomato 蛋白による蛍光発色を確認する予定である。

図 6. HCN4 遺伝子下流領域への tdTomato 遺伝子導入



【今後の研究予定】

本研究で樹立された遺伝子導入 iPS 細胞株を用いて、純度の高いペースメーカー細胞を作製するために、蛍光発色を指標としたペースメーカー細胞の分化プロトコルを樹立する。分化プロトコル樹立には、蛍光発色を利用した多くの低分子化合物のスクリーニングをする。さらにペースメーカー細胞の純度を高めるために薬剤耐性遺伝子を用いた純化を行う。カニクイザルの房室ブロック作製による徐脈モデルを作製し、高純度の iPS 細胞由来ペースメーカー細胞のバイオペースメーカーとしての有効性を評価する。

【謝辞】

本研究はアステラス病態代謝研究会研究助成金により遂行されました。ここに厚く御礼申し上げます。