

microRNA を用いたヒト多能性幹細胞由来成熟心筋細胞の作製と臨床応用

遠山周吾

慶應義塾大学医学部 循環器内科

【研究の背景】

患者iPS由来心筋細胞は患者本人の遺伝子を搭載しており、創薬スクリーニング等に利用されることが期待されている。しかし、解析対象として用いられているヒトiPS由来分化細胞は、不均一な細胞集団であり、また非心筋細胞の含有率などにおけるばらつきが大きいと、正確に表現型を解析することは困難なのが現状である。それらの影響を軽減するためには、純度の高い心筋細胞を得ることが重要である。これまでの心筋純化精製法の多くは、我々が報告した手法も含めてFACSを用いなければならなかったため、創薬スクリーニング等においてより多くの心筋細胞を用いる際にはさらに簡便な方法が必要とされていた。そこで申請者は、心筋細胞と非心筋細胞における網羅的代謝解析の結果から、遺伝子改変技術やFACSを用いず、培養液を変えるだけで心筋細胞のみを純化精製することに成功した^{2~4)}

【目 的】

ヒト人工多能性幹（iPS）細胞はあらゆる細胞に分化可能であり、再生医療や創薬スクリーニングへの応用が期待されている。しかし、ヒト iPS 由来分化細胞は非心筋細胞や様々な成熟段階の心筋細胞から構成される不均一な集団であるため、創薬スクリーニングにおける表現型のばらつきが問題となっている。申請者は既にヒト心筋細胞を代謝制御により純化精製する技術を確立している^{2~4)}。本課題では、microRNA により均一な成熟心筋細胞を作製し、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた創薬スクリーニングに応用することを目的としている。

【方 法】

【1. ヒト iPS 細胞由来純化心筋細胞における大量培養法の確立】

まず初めにヒト iPS 細胞由来純化心筋細胞を大量に必要とするため大量培養系の構築を目指す。

【2. ヒト iPS 細胞由来純化心筋細胞における長期培養における成熟化の評価】

大量培養システムによって得られた純化心筋細胞において長期培養により成熟化が促進するか否かを評価する。

【3. MLC2v-EGFP knockin ヒト iPS 細胞株の樹立】

CRISPR/Cas9 システムを用いて、MLC2v-EGFP knockin ヒト iPS 細胞株の樹立する。

【4. 成熟化を促進する遺伝子探索】

特定の遺伝子を過剰発現あるいはノックダウンすることにより、代謝的成熟化が促進されるか否かを遺伝子発現、蛋白発現量の変化により評価する。また特定の遺伝子を制御する microRNA を探索する。

【結 果】

申請者はまず初めに安定的に大量の心筋細胞を得るため 2 次元培養系を利用した大量培養系の構築を目指した。その結果、4 段の多層培養プレート(1 段あたり 632cm²、4 段で使用する培養液 500ml)を用いることにより、2 週間でおよそ 5 億個の細胞が得られることがわかった(in revision)。大量培養システムによって得られた純化精製直後のヒト iPS 細胞由来

心筋細胞と、さらに 1 か月培養した心筋細胞における心室筋マーカーの発現を比較したところ、純化精製直後のヒト iPS 細胞由来心筋細胞は半分程度が MLC2v 陽性であったのに対して、長期培養したものでは 90%が MLC2v 陽性であることがわかった (in preparation)。さらに申請者は評価系の効率化を図るため CRISPR/Cas9 システムを用いることで MLC2v-EGFP knockin ヒト iPS 細胞株を樹立することに成功した。また、炎症惹起や血管新生に関わる angiopoietin-like protein2 の発現を抑制することにより、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞において PGC1a/PPARα の発現が上昇すると共に、AKT シグナルが活性化し、SERCA2a を上昇させることが明らかとなった⁵⁾。

【考 察】

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞において心室筋マーカーである MLC2v がほぼ全ての細胞で発現するには、分化誘導開始後およそ 2 か月かかることを確認している。また、angiopoietin-like protein2 を knockdown することにより心筋細胞における代謝的成熟化が促進されることが示されたが、angiopoietin-like protein2 は miR221/222 によって抑制されるため、これらの microRNA を強制発現することにより成熟化を促進し、心筋細胞における成熟度の不均一性を解消できることが予想される。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

申請者はさらに心筋細胞の成熟度の不均一性の問題に対して microRNA によりヒト iPS 由来心筋細胞における成熟化を促進するという他には類のない革新的手法を開発することを目指している。長期培養することなく、microRNA により短期間で成熟心筋細胞を作製することによりヒト iPS 由来心筋細胞を用いた創薬スクリーニング研究が大いに発展すると期待される。

【参考・引用文献】

1. Hattori F, Chen H, Yamashita H, **Tohyama S**, Satoh YS, Yuasa S, Li W, Yamakawa H, Tanaka T, Onitsuka T, Shimoji K, Ohno Y, Egashira T, Kaneda R, Murata M, Hidaka K, Morisaki T, Sasaki E, Suzuki T, Sano M, Makino S, Oikawa S, Fukuda K. Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes. *Nature Methods*. 2010 Jan;7(1):61-6.
2. **Tohyama S**, Hattori F, Sano M, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Hashimoto H, Suzuki T, Yamashita H, Satoh Y, Egashira T, Seki T, Muraoka N, Yamakawa H, Ohgino Y, Tanaka T, Yoichi M, Yuasa S, Murata M, Suematsu M, Fukuda K. Distinct Metabolic Flow Enable Large-Scale Purification of Mouse and Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Cell Stem Cell* 2013 Jan 3;12:127-37.
3. **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 Metabolism* 2016 Apr 12; 23:663-674.
4. **Tohyama S**, Tanosaki S, Someya S, Fujita J, Fukuda K. Manipulation of Pluripotent Stem Cell Metabolism for Clinical Application. *Current Stem Cell Reports* (in press)
5. Tian Z, Miyata K, Kadomatsu T, Horiguchi H, Fukushima H, **Tohyama S**, Ujihara Y, Okumura T, Yamaguchi S, Zhao J, Endo M, Morinaga J, Sato M, Sugizaki T, Zhu S, Terada K, Sakaguchi H, Komohara Y, Takeya M, Takeda N, Araki K, Manabe I, Fukuda K, Otsu K, Wada J, Murohara T, Mohri S, Yamashita JK, Sano M, Oike Y. ANGPTL2 activity in cardiac pathologies accelerates heart failure by perturbing cardiac function and energy metabolism. *Nature Communications* 2016;7:13016.