

多能性幹細胞由来心臓ペースメーカーの開発

門田 真

信州大学 バイオメディカル研究所 バイオテクノロジー・生体医工学部門

【研究の背景】

徐脈性不整脈の治療法である機械式ペースメーカー植込み術は、機械性能の向上とともに症例数が増加している。しかし、機械式ペースメーカーは、定期的な電池交換術が必要であり高額な医療費の問題に加え、手術後感染の増加が大きな問題となっている。多能性幹細胞由来心筋細胞には心室筋・心房筋とペースメーカー細胞が含まれていることから、多能性幹細胞を用いた“生物学的ペースメーカー”の開発研究が行われている。しかし、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、生物学的ペースメーカーの実用化に至っていない。

【目 的】

本研究の目的は、多能性幹細胞由来心筋細胞からペースメーカー細胞を純化し、細胞治療による生物学的ペースメーカーを開発することである。

【方 法】

心筋トロポニン T (cTnT) 下に GFP 蛍光が発現するヒト ES 細胞株の、ペースメーカー細胞のマーカーである X 遺伝子下流に CRISPR/Cas9 を用いて DsRed 遺伝子と薬剤耐性遺伝子をノックインしてレポーター遺伝子導入細胞株を樹立する。樹立した細胞株から分化誘導を行い、薬剤を用いてペースメーカー細胞を純化精製する。分化誘導後約 20 日前後で冷凍保存する。解析・細胞移植における対照群として薬剤選択を行わずに同期間培養した細胞を保存する。保存した細胞から RNA を抽出して RT-PCR により発現遺伝子を解析し、培養して免疫染色を行う。

【結 果】

ヒト ES 細胞株 H9 のペースメーカー細胞特異的遺伝子 X の下流に蛍光タンパク遺伝子と薬剤耐性遺伝子を CRISPR/Cas9 を用いて遺伝子導入し、レポーター遺伝子導入細胞株を作製に成功し、分化誘導を行ったが、DsRed の蛍光発現が弱く、ペースメーカー細胞への誘導効率が低いため、移植に必要な細胞数が確保できなかった。

DsRed の発現が少なかった原因としては、最近行った RNA シークエンスの結果から、遺伝子 X の発現が少ないことが考えられた。そこで、別のペースメーカー特異的遺伝子 Y の下流に同様の蛍光タンパクと薬剤耐性遺伝子を遺伝子導入することとし、現在、レポーター細胞の作製を行っている。

【考 察】

多能性幹細胞由来細胞から分化誘導した心筋細胞のうち、ペースメーカー細胞の比率は低く、最も効率の良い方法でも約 50%がペースメーカー細胞になるというプロトコルであり(Nat Biotechnol 2017)、いまだ多能性幹細胞からペースメーカー細胞を大量かつ高純度に作製することが難しい。

今回作製した細胞株ではペースメーカー細胞の純化に至らなかったが、標識遺伝子を変更してレポーター細胞株の樹立に成功すれば、新たな細胞治療への応用が可能になると考えられる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

細胞治療による生物学的ペースメーカーの開発が成功すれば、機械式ペースメーカーの問題点である電池寿命や術後感染を解決した上で、より生理的な心拍応答が可能となり、QOL が向上し長期的に機能することが期待できる。しかしながら、培養に伴うコストの問題や、治療に伴う合併症やペースング不良などを認める可能性があり、安全な移植方法を確立するまでは、機械式ペースメーカーによるバックアップが必要になると考えられる。

【参考・引用文献】

Protze SI, Liu J, Nussinovitch U, Ohana L, Backx PH, Gepstein L, Keller GM. Sinoatrial node cardiomyocytes derived from human pluripotent cells function as a biological pacemaker. Nat Biotechnol 35:56–68, 2017