

足場の硬化による心筋細胞の機能低下メカニズムの解明

魚崎英毅

自治医科大学分子病態治療研究センター 再生医学研究部

【研究の背景】

心疾患では心臓に線維化が起こり、硬くなることが知られている。また、足場が硬くなることで心筋細胞内の筋繊維(サルコメア)の崩壊や電気生理学的な観点での機能低下が起こることも以前より報告がある¹⁾。しかしながら、成体から単離した心筋細胞は長期培養が困難であり、培養することで脱分化してしまうため、足場が硬くなることと、心筋細胞の機能低下をつなぐ分子メカニズムは解析されていない。一方、多能性幹細胞から誘導した心筋細胞(PSC-CMs)は、分化直後の未成熟な状態で生体内に移植すると成体相当まで成熟するが、プラスチック上で長期培養を行っても胎生後期相当で成熟が停止する^{2,3)}。さらに、長期培養したPSC-CMsを移植しても成熟しない(未発表)。これらのことからPSC-CMsも足場の硬さによりある種の機能低下が見られると考えられる。組織の硬さを規定する要素として、細胞自体の変化(細胞骨格など)や、細胞外マトリックスが考えられる。特に細胞外マトリックスは受容体を介して、細胞内へとシグナル伝達も行うなど、硬さの規定だけではない多面的な機能を有すると考えられる。しかし、PSC-CMsの成熟を含む、心筋細胞の機能制御機構は不明である。

【目 的】

本研究では、培養器材の硬さや細胞外マトリックスが心筋細胞の機能制御を担うメカニズムを明らかにするため、まずPSC-CMsの成熟を指標とした解析を行った。

【方 法】

1. 新規心筋細胞成熟レポーターの樹立

成熟した心筋細胞特異的に発現する *Myom2* 遺伝子座に TagRFP をノックインした、Myom2-RFP ES 細胞を樹立した。ノックインでは CRISPR/Cas9 を用いた効率的な方法を用いた⁴⁾。得られた ES 細胞を Activin A、BMP4、VEGF、bFGF、FGF10 により処理することで PSC-CMs へと分化誘導し、以下の実験に用いた。

2. 発生過程での細胞外マトリックス発現プロファイル

胎生 11 日目から生後 56 日目までのマウス心臓より RNA を抽出し、RNA-seq を行った。得られたトランスクリプトームから特に細胞外マトリックスに限った遺伝子発現を解析した。

3. 各種細胞外マトリックスのスクリーニング

分化誘導後 10 日目の PSC-CMs を Gelatin (コントロール)、あるいは各種細胞外マトリックス上で 2-4 週間培養し、Myom2-RFP の陽性率、蛍光強度を評価した。用いた細胞外マトリックスは大阪大学関口清俊教授より供与を受けた Laminin E8 フラグメント各種(LN-111 から LN521 まで 11 種)、市販の Collagen I、III、IV、Fibronectin の合計 15 種類である。

4. 心筋細胞の機能評価

Myom2-RFP 陽性細胞と陰性細胞の機能を評価するために、免疫染色による細胞内構造の評価、二核化比率、細胞内カルシウムトランジェントなどの評価を行った。

【結 果】

1. Myom2-RFP の樹立と RFP 陽性細胞の評価

CRISPR/Cas9 を併用したノックインを行うことで、正しく RFP がノックインされた ES 細胞株を樹立した。約 15% の株で正しくノックインされていた。この細胞株を心筋細胞へと分化誘導すると、7 日目ごろから拍動が観察された。10 日目までは RFP 陽性細胞が観察されないが、21 日目に約 50%、28 日目には 70% 程度が RFP 陽性となった。

RFP は α -actinin と交互となる染色パターンを呈し、M-line に局在する Myom2 と Myom2-RFP は同様の局在であると考えられる。Myom2-RFP 陽性細胞は RFP 陰性細胞と比べ大型であり、サルコメア長が長い。また、分化 28 日目には RFP 陽性細胞の約 50% で二核化しており、10% 程度の RFP 陰性細胞に比べて有意に二核化比率が高かった。さらに、RFP 陽性細胞では明らかなカルシウムトランジェントが観察されたのに対して、陰性細胞では非常に弱いピークであった。

2. 発生過程での細胞外マトリックス発現プロファイル

E11 から P56 までの細胞外マトリックスの発現プロファイルより、胎生期、新生児期あるいは成体で特異的に発現する細胞外マトリックスを同定した。これらのうち、市販で購入可能なもの、および共同研究者より提供を受けられたものについて解析を行うこととした。

3. 細胞外マトリックスと心筋細胞の成熟

LN111-LN521 までの 11 種類の E8 フラグメント、Collagen (Col)-I, III, IV および Fibronectin (Fn) 上で PSC-CMs を培養し、Myom2-RFP の陽性率および蛍光輝度を培養 4 週間で解析した。いずれの細胞外マトリックスも Myom2-RFP の陽性率に影響は与えなかったが、一方で、LN111, 121, 311, 332, 421, 511, 521, Col-I, Fn の 9 種類で RFP 蛍光輝度の上昇が認められた。LN511, 521 上では Myom2-RFP の蛍光輝度が他の細胞外マトリックス上の約 2 倍と非常に強い蛍光輝度であった。

続いて免疫染色により PSC-CMs のサルコメア長や形態を評価したところ、LN511, 521 によりサルコメア長の延長、細胞サイズの増大が認められた。さらに、心筋細胞の成熟に伴い発現量が増加する Connexin-43 が認められ、その局在から新生児程度の成熟であることが予想された⁵⁾。さらに、フラックスアナライザーを用いた解析からより、ミトコンドリア機能の成熟も認められ、細胞外マトリックスを変えるだけで、多面的な心筋細胞の成熟が得られることが明らかとなった。

【考 察】

本研究により、LN511, 521 の心筋細胞成熟における新たな機能を見出した。一方、他のラミニンではこのような強い効果は認められなかった。本研究で用いたラミニン E8 フラグメントはインテグリンとの結合能のみを保持した小型のラミニンであることから、インテグリンを介した機能であることが予想される。それぞれのラミニンとインテグリン受容体は結合特性が異なるが、一般的に下流のシグナル伝達は同様であると考えられている。そのため、どのようなメカニズムで LN511, 521 が他のラミニンとは異なる結果をもたらしたのか、今後の検討を要する。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究により、より成熟した PSC-CMs を得ることができるようになった。しかし、得られた心筋細胞の成熟度は未だ新生児程度である。PSC-CMs は創薬や疾患研究への応用が期待されているが、その成熟度が低いために、応用範囲が限定されている。さらに研究を進め、PSC-CMs をより成熟させることができるようになれば、より臨床へと貢献できるものと考えられる。

【参考・引用文献】

- Galie, P. A., Khalid, N., Carnahan, K. E., Westfall, M. V. & Stegemann, J. P. Substrate stiffness affects sarcomere and costamere structure and electrophysiological function of isolated adult cardiomyocytes. *Cardiovasc. Pathol.* **22**, 219-227 (2013).

2. Uosaki, H. *et al.* Transcriptional Landscape of Cardiomyocyte Maturation. *Cell Rep.* **13**, 1705-1716 (2015).
3. Cho, G.-S. *et al.* Neonatal Transplantation Confers Maturation of PSC-Derived Cardiomyocytes Conducive to Modeling Cardiomyopathy. *Cell Rep.* **18**, 571-582 (2017).
4. Ran, F. A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* **8**, 2281-2308 (2013).
5. Vreeker, A. *et al.* Assembly of the Cardiac Intercalated Disk during Pre- and Postnatal Development of the Human Heart. *PLoS ONE* **9**, e94722 (2014).