

## 生体心臓を真に再現する 4 倍体 iPS 細胞由来心筋細胞モデルの確立

宮岡佑一郎

公益財団法人東京都医学総合研究所 先端基礎医科学研究分野 再生医療プロジェクト

### 【研究の背景】

iPS 細胞由来心筋細胞 (iPS-CM) は、従来のマウスなどの実験動物モデルと異なり、ヒト細胞により心筋症を再現できる点で極めて有用である<sup>1)</sup>。しかしながら、一般的に iPS-CM は未熟であることが、iPS 細胞心筋症モデルや心毒性検出試験などにおいて常に課題である。生体における心筋細胞の成熟過程においては、思春期に入る頃に、細胞分裂を伴わない DNA 複製を介して、2 倍体から 4 倍体へと染色体数が倍加することが大きな転換点である。成人の心筋細胞は、実にその 80% 以上が 4 倍体以上に多倍体化している<sup>2)</sup>。しかし、通常の iPS-CM は約 10% しか 4 倍体化せず、生体の心筋細胞を全く再現できていない。真に生体心筋細胞を iPS 細胞によってモデルするには、生体の心筋細胞の染色体数を再現する必要があると考えられる。しかしこれまで、小分子やサイトカインの添加など、様々な手法で iPS-CM の成熟度を高める試みがなされてきたが、倍数性を増加させるほどの成熟を促すことはできていない<sup>3)</sup>。

### 【目 的】

申請者は、2 倍体 iPS 細胞同士の融合により、4 倍体 iPS 細胞を樹立してから心筋細胞へと分化誘導を行うことで、4 倍体 iPS-CM を得ることに世界で初めて成功した (国際特許申請済み PCT/JP2024/080141)。本研究では、この 4 倍体 iPS-CM がより忠実に生体の心筋細胞を再現し、心筋症モデルとして優れていることを全世界に示すことを目的とした。4 倍体 iPS-CM の有用性を明らかにすることで、心筋症の発症機序解析技術を革新するとともに、創薬スクリーニングへの活用も促し、治療薬開発にも貢献したい。

### 【方 法】

健常日本人男性由来 iPS 細胞 (WTC11)<sup>4)</sup> の融合により 4 倍体 iPS 細胞を樹立した。この 4 倍体 iPS 細胞から分化させた心筋細胞について、2 倍体 iPS 細胞由来心筋細胞との比較を下記の通り実施して、その成熟度を評価した。まず、CardioExcyte 96 (Nanon Technologies) を用いて、心筋細胞の電気抵抗値を測定し、収縮力、収縮速度、心拍数を評価した。次に、カリウムチャネル阻害効果が知られている抗アレルギー薬である Terfenadine を、900 nM まで濃度を調整しながら培地に添加し、電気抵抗値を測定することで心筋細胞の薬剤に対する抵抗性を評価した。

### 【結 果】

(1) 4 倍体 iPS 細胞由来心筋細胞は、2 倍体 iPS 細胞由来心筋細胞よりも収縮力が向上していた

通常の 2 倍体 iPS 細胞である WTC11 と、WTC11 同士を融合して樹立した 4 倍体 iPS 細胞を、それぞれ心筋細胞へと分化誘導し、その電気抵抗値を測定した。その結果、4 倍体 iPS 細胞由来心筋細胞の方が、より電気抵抗値の変化量が大きく、またその状態がより長期間にわたって持続されることが明らかとなった。生体心筋細胞も成熟に伴って収縮力が向上するため、4 倍体 iPS 細胞由来心筋細胞の方がより成熟しているという、期待通りの結果が得られた。

(2) 4 倍体 iPS 細胞由来心筋細胞は、2 倍体 iPS 細胞由来心筋細胞よりも収縮速度が向上していた

次に、電気抵抗値の収縮に伴う変化の速度を計算したところ、4 倍体 iPS 細胞由来心筋細胞の方が、2 倍体 iPS 細胞由来心筋細胞よりも、有意に速い収縮を示すことが明らかとなった。その傾向は、細胞を電気抵抗値測定用プレートに播種後 5 日目から観察され、その後も維持された。一方で、弛緩速度については 2 倍体および 4 倍体 iPS 細胞由来心筋細胞の間で有意な差は観察されなかった。これは、4 倍体 iPS 細胞由来心筋細胞が、より成熟した心筋細胞としての特徴を示すことを表している。

(3) 4 倍体 iPS 細胞由来心筋細胞は、2 倍体 iPS 細胞由来心筋細胞と比較して、より強い心毒性に対する対抗性を示した

心筋細胞は、成熟とともに心毒性を持つ薬剤などにより強い抵抗性を示す<sup>5)</sup>。また、iPS 細胞由来心筋細胞を創薬に活用するためには、心毒性を持つ薬剤に対する反応性は非常に重要な特性となる。そこで、2 倍体および 4 倍体 iPS 細胞由来心筋細胞に、カリウムチャネル阻害効果を持つ Terfenadine を異なる濃度で添加し、電気抵抗値測定によって拍動に対する影響を評価した。

その結果、2 倍体 iPS 細胞由来心筋細胞は、500 nM の Terfenadine 添加により、拍動を完全に停止したが、4 倍体 iPS 細胞由来心筋細胞は、900 nM の Terfenadine 存在下でも拍動を維持することが明らかとなった。この結果は、心毒性への抵抗性という観点でも、期待した通りに 4 倍体 iPS 細胞由来心筋細胞の方が、より成熟した特性を持つことを示している。

## 【考 察】

期待した通り、4 倍体 iPS 細胞由来心筋細胞は、2 倍体 iPS 細胞由来心筋細胞よりも強く、速い収縮を示し、より成熟した特徴を持っていた。本研究開始前に実施済みであった RNAseq による網羅的な遺伝子発現解析から、サルコメア関連遺伝子やイオンチャネル遺伝子の発現を 2 倍体および 4 倍体 iPS 細胞由来心筋細胞の間で比較したが、明瞭な差は認めることができなかった。それにも拘らず、このように収縮様式に明確な差が生じたことは予想外であった。既に観察しているミトコンドリア量の増加によって、収縮に必要な ATP が 4 倍体 iPS 細胞由来心筋細胞においてより多く供給されていることが原因の 1 つである可能性が考えられる。別の原因として、mRNA レベルでは発現に有意な差が認められなくとも、タンパク質レベルでは、サルコメア関連遺伝子やイオンチャネル遺伝子の発現量が変化している可能性も考えられる。したがって、現在定量的かつ網羅的な質量分析により、2 倍体および 4 倍体 iPS 細胞由来心筋細胞において発現するタンパク質の解析を進めている。この解析によって、観察された倍数性に依存した収縮の様式の変化が生じる機構を明らかにしていきたい。

収縮様式の相違に加えて、Terfenadine に対する抵抗性に、2 倍体および 4 倍体 iPS 細胞由来心筋細胞の間で差が認められた。生体心筋細胞の特性から期待された通り、4 倍体 iPS 細胞由来心筋細胞の方が、成熟した心筋細胞の特徴であるより強い抵抗性を示した。現在のところ、この抵抗性の相違が生じる分子機構も明らかとはなっていない。上記の通り、RNAseq の結果からは、イオンチャネルなどの mRNA レベルの発現には倍数性による相違が認められない。今後実施する質量分析によるタンパク質レベルの発現解析により、4 倍体 iPS 細胞由来心筋細胞の抵抗性を生み出す分子機構を明らかにしたい。

本研究により、4 倍体 iPS 細胞の樹立とその心筋細胞分化によって、従来の 2 倍体 iPS 細胞由来心筋細胞に比較して、より忠実に生体心臓を再現する優れた心筋細胞モデルが作製可能であることを示すことができた (in Revision)<sup>6)</sup>。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

細胞融合により樹立した 4 倍体 iPS 細胞から分化させた心筋細胞は、従来の 2 倍体 iPS 細胞由来心筋細胞よりも成熟した心筋細胞としての特徴を示したため、これまででない、生体をより忠実に反映する疾患モデルが確立できると期待される。また、心毒性検出のための創薬試験や、将来的には細胞治療にも応用が期待できる。

## 【参考・引用文献】

1. Clancy CE, Santana LF. Advances in induced pluripotent stem cell-derived cardiac myocytes: technological breakthroughs, key discoveries and new applications. *J Physiol* 2024;602:3871-3892.

2. Derks W, Bergmann O. Polyploidy in cardiomyocytes: roadblock to heart regeneration? *Circ Res* 2020;126:552-565.
3. Ahmed RE, Anzai T, Chanthra N, et al. A Brief Review of Current Maturation Methods for Human Induced Pluripotent Stem Cells-Derived Cardiomyocytes. *Front Cell Dev Biol* 2020;8:178.
4. Miyaoka Y, Chan AH, Judge LM, et al. Isolation of single-base genome-edited human iPSC cells without antibiotic selection. *Nat Methods* 2014;11: 291-293.
5. da Rocha AM, Campbell K, Mironov S, et al. hiPSC-CM Monolayer Maturation State Determines Drug Responsiveness in High Throughput Pro-Arrhythmia Screen. *Sci Rep* 2017;7:13834.
6. Nakajima I, Shimane M, Holmstrom G, et al. Derivation of human post-mitotic cardiomyocytes from tetraploid iPSCs. [bioRxiv 10.1101/2025.06.23.661005](https://doi.org/10.1101/2025.06.23.661005).