

博士論文（要約）

Comparison of cardiomyocyte differentiation potential between type 1 diabetic donor- and non-diabetic donor-derived induced pluripotent stem cells

(1型糖尿病ドナーと非糖尿病ドナーから作成された人工多能性幹細胞の心筋細胞分化能の比較に関する研究)

旭川医科大学大学院医学系研究科博士課程医学専攻

菊地 千歌

(Martin Bienengraeber, Scott Canfield, Andrew Koopmeiner,
Richard Schäfer, Zeljko J. Bosnjak, Xiaowen Bai)

<研究目的>

1型糖尿病（T1DM）は若年者の糖尿病で最も多い病型であり、T1DMも2型糖尿病と同様、心筋梗塞の主要なリスクファクターである。心筋梗塞による末期の心不全の最も有効な治療は現時点では心筋移植もしくは心移植のみである。しかしながら移植心の不足や免疫拒絶反応などの問題があり十分とは言えず、新しい治療法が望まれている。近年、ドナーの遺伝情報を持ち、未分化のまま増殖してすべての胚葉由来の細胞に分化する能力を持つ多能性幹細胞（iPSC）が注目をされている。iPSCは臓器の供給不足の問題、免疫拒絶反応の問題、胚幹細胞にみられる倫理的な問題がないため、臨床応用への期待が高まっている。様々な疾患を持つ患者の体細胞から作成されたiPSCとその分化能が報告されているが、T1DM患者から作成したiPSCの心筋への分化能を研究した報告は未だない。また、iPSCsから心筋細胞への分化誘導効率は誘導法により大きな差がある。我々はT1DM患者から作成したiPSCs(T1DM-iPSCs)と、非糖尿病患者から作成したiPSCs(N-iPSCs)の心筋細胞への分化能と、分化した心筋細胞（T1DM-iPSC-CMs、N-iPSC-CMs）の細胞呼吸エネルギー代謝を比較検討した。

<材料・方法>

本研究ではN-iPSCsとT1DM-iPSCsの（1）増殖率、（2）心筋への分化誘導効率、（3）分化した心筋細胞の活動電位、（4）細胞呼吸エネルギー代謝、を評価し考察した。

T1DM-iPSCsはDr. Douglas Melton (Department of Stem Cell and Regenerative Biology, Harvard University)、N-iPSCsはDr. Stephen Duncan (Department of Cell Biology, Medical College of Wisconsin)の研究室から供与されたものを用いた。いずれのiPSCsもドナーの皮膚線維芽細胞に4種類の転写因子を導入して作成された。iPSCsはフィーダー細胞上で培養して増殖させ、細胞コロニーが70-80%融合したところで継代した。

継代中、幹細胞マーカーのSSEA4とOct4で免疫染色しiPSCsであることを確認した。

（1）N-iPSCsとT1DM-iPSCsの増殖率の評価

マトリゲルでコーティングした6穴培養プレートに 2.0×10^5 cells/wellずつ播種し、24時間毎に1wellずつhemocytometerを用いて細胞数を数えた。

（2）心筋への分化誘導効率の評価

Lian (Proc. Natl. Acad. Sci. 2012)らのプロトコールに沿ってiPSCsにCHIR-99021（GSK-3β阻害剤）とIWP-2（Wnt阻害剤）を添加し、心筋への分化を誘導した。

分化誘導開始から60日目の自己拍動している細胞を心筋マーカーのanti-sarcomeric alpha actininとanti-troponin Tで免疫染色した。心筋細胞への分化効率はTroponin T陽性細胞数/(troponin T陽性細胞数+TroponinT陰性細胞数) x 100%として算出した。

(3) 分化した心筋細胞の活動電位の評価

分化誘導開始から 60 日目の自己拍動している細胞 (T1DM-、N-iPSC-CMs) の活動電位を細胞内電位記録法を用いて測定し、活動電位持続時間 (APD)、脱分極の最大加速度(dV/dt)、最大拡張電位 (MDP) を記録しこれを基に洞結節様、心房様、心室様に分類した。 β アドレナリン受容体刺激への反応はイソプロテレノールを培養液に添加し、自己拍動の拍動数の変化を顕微鏡下に観察して行った。

(4) 細胞呼吸エネルギー代謝の評価

T1DM-、N-iPSC-CMs の酸素消費量 (OCR) と細胞外水素イオン濃度 (ECAR) を Seahorse XF24 Extracellular Analyzer を用いて測定した。測定時の培養液には糖濃度が 5mM、25mM の 2 種類のものを用い、それぞれの培養液下で Oligomycin (ATP 合成酵素阻害剤)、FCCP (脱共役剤)、AntimycinA (ミトコンドリア複合体III阻害剤) を連続的に添加して OCR と ECAR を同時に測定した。Mitochondrial basal OCR = (Baseline OCR – OCR under AntimycinA)、ATP-linked OCR = (Baseline OCR – OCR under oligomycin)、OCR related to proton leak = (OCR under oligomycin – OCR under AntimycinA)、Mitochondrial reserve capacity = (OCR under FCCP – Baseline OCR)、Non-mitochondrial OCR = OCR under AntimycinA、と定義し Mitochondrial basal OCR に対するそれぞれの割合を算出した。また、培養液の糖濃度を急激に上昇させたときの OCR、ECAR も測定した。

<成績>

(1) T1DM-iPSCs と N-iPSCs はともに SSEA4 と Oct4 の染色で確認された未分化多能性を維持し、同等の増殖能を有していた。細胞倍增時間はともに約 22 時間であった。

(2) T1DM-iPSCs と N-iPSCs はともに自己拍動する、sarcomeric alpha actinin と TroponinT 陽性の細胞へ分化した。TroponinT 陽性細胞の割合はともに 90%以上であった。

(3) T1DM-iPSCs と N-iPSCs はともに心筋特有の洞結節様、心房様、心室様の活動電位を有する細胞に分化し、 β アドレナリン受容体刺激に反応した。

(4) 培養液糖濃度に因らず、T1DM-iPSC-CMs の Mitochondrial basal OCR は N-iPSC-CMs よりも低値であった。Mitochondrial basal OCR に対する ATP-linked OCR、OCR related to proton leak、Mitochondrial reserve capacity の割合は T1DM-iPSCs と N-iPSCs で同等であった。同様に、T1DM-iPSC-CMs の Baseline ECAR は N-iPSC-CMs よりも低値であったが、Oligomycin を添加したときの ECAR の変化の割合は同等であった。

細胞外糖濃度の急激な増加では N-、T1DM-iPSC-CMs ともに OCR に変化はなかったが、ECAR は一過性に上昇した後ベースラインに戻った。

<考案>

この研究ではT1DM-iPSCsとN-iPSCsが同等の増殖能と心筋への分化能を持つことを明らかにした。トロポニン T 染色で確認された心筋への分化効率はともに 90%以上であり、どちらの iPSC から洞結節様、心房様、心室様の活動電位を有する細胞へ分化した。細胞外の糖濃度に関らず T1DM-iPSC-CMs, N-iPSC-CMs の OCR, ECAR は一定で、これらの細胞の酸化的リン酸化と解糖系は細胞内で制御され、かつこれらの代謝経路の間で遅滞なく切り替えが行われていた。T1DM-iPSC-CMs は N-iPSC-CMs とともに有望な自家移植細胞源であることが示された。

心筋再生医療に iPSC-CMs を用いるためには、まず第一に、心筋細胞への高い分化効率が必要である。iPSC への心筋への分化誘導法は多く報告されているが本研究では Lian らが発表した Wnt シグナル経路を調整操作するプロトコールに沿って分化を行った。T1DM-iPSC-CMs, N-iPSC-CMs とともに高い率で心筋に分化し Lian らの誘導プロトコールの再現性が示された。しかし我々が分化誘導した心筋細胞は他の iPSCs からの心筋への報告と同様、均一ではなく、洞結節様、心房様、心室様の活動電位を持つ細胞が混在していた。iPSC-CMs を障害部位への移植心筋として用いるためには均一な単一の心筋細胞群を得る事が今後の課題である。

細胞呼吸エネルギー代謝は正常な細胞機能の基礎となるものである。全ての細胞はその機能に見合った需要と供給を満たすエネルギー産生機構を持っている。心筋細胞では糖の取り込みと代謝は、ATP 需要と、糖や糖以外のエネルギー源の供給のバランスの上に高度に制御されていることが知られている。我々が分化誘導した iPSC-CMs も Mitochondrial basal OCR, ATP-linked OCR, OCR related to uncoupling, reserve capacity は細胞外の糖濃度に影響されなかった。Oligomycin (ATP 合成酵素阻害剤) の添加に伴った ECAR の上昇は解糖系速度の上昇を表し、iPSC-CMs が ATP 産生の経路を酸化的リン酸化から解糖系に切り替えたことを示している。細胞外糖濃度の急激な上昇では、OCR には変化が見られなかったが、ECAR 一過性に上昇し、その後すぐに基線に戻った。また、解糖系抑制剤を添加すると糖添加時と同様 OCR には変化が見られなかったが ECAR は一過性に低下し、その後すぐに基線に戻った。これらの結果は、T1DM-iPSC-CMs, N-iPSC-CMs とともに、糖の取り込みと ATP 産生が、解糖系と酸化的リン酸化のレベルで制御されていることを示唆している。

T1DM-iPSC-CMs の Mitochondrial basal OCR, Basal ECAR は N-iPSC-CMs よりも低値であった。低い OCR、低い ECAR は、エネルギー源/酸素の供給、または取り込みが少ない、もしくはエネルギー需要が低いためのいずれかの理由で代謝活動が低い可能性を示している。エネルギー源/酸素の供給不足に関しては、我々の実験結果からは除外される。また、ATP 合成酵素阻害剤や脱共役剤による反応が N-iPSC-CMs と同等であったため、エネルギー源/酸素の取り込みの能力は同等であると考えられる。心筋細胞のエネルギー需要を規定する主要な因子は拍動数と

収縮力である。拍動数は心筋細胞の種類により異なる。我々が分化した T1DM-iPSC-CMs では比較的拍動数の遅い心室様の細胞が多く、N-iPSC-CMs では比較的拍動数の速い心房様の細胞の割合が高かった。これが ATP 需要の違いとなり、OCR,ECAR の違いとなったと説明出来なくはないが、我々が調べた細胞の数から結論を出すことは尚早である。

T1DM-iPSC-CMs と N-iPSC-CMs の違いが、ランダムなバリエーションから来るものなのか、T1DM 特有の要素から来るものなのかは現時点で判断不能である。かなり数の iPSC-CMs が研究されて初めて出来る。

<結論>

我々は初めて、T1DM 患者から作成した iPSC を、心筋特有の蛋白を発現し活動電位をもつ自己拍動する機能的な心筋細胞に高い効率で分化させた。非糖尿病患者から作成した iPSC から分化させた心筋と同様、細胞呼吸エネルギー代謝は酸化的リン酸化、解糖系のレベルで制御されていた。ドナーの遺伝情報を保持した iPSC から分化した心筋細胞は、梗塞心筋の治療を必要とする T1DM 患者の不足することのない自家移植細胞源として有望である。

<引用文献 (3 編) >

Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5):861-872; 2007

Lian, X.; Hsiao, C.; Wilson, G.; Zhu, K.; Hazeltine, L. B.; Azarin, S. M.; Raval, K. K.; Zhang, J.; Kamp, T. J.; Palecek, S. P. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 109(27):E1848-1857; 2012

Nishikawa, S.; Goldstein, R. A.; Nierras, C. R. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9(9):725-729; 2008.