

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	堀越 佑一
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Fatty Acid-Treated Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Human Cardiomyocytes Exhibit Adult Cardiomyocyte-Like Energy Metabolism Phenotypes (iPS 細胞由来心筋細胞は、脂肪酸処理によって成熟心筋細胞様のエネルギー代謝へ変化する)</p> <p>共 著 者 名</p> <p>Yasheng Yan, Maia Terashvili, Clive Wells, Hisako Horikoshi, Satoshi Fujita, Zeljko J. Bosnjak, Xiaowen Bai</p> <p>Cells. 2019 Sep; 8(9): 1095 (Published online 2019 Sep 17.)</p> <p>研 究 目 的</p> <p>人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell; iPSC) は分化万能性と自己複製能を持つ多能性幹細胞であり再生医療の重要な役割を担う。iPSC 由来心筋細胞 (iPSC-CMs) は iPSC から分化誘導された人工心筋細胞であり、心筋再生や疾患モデル作製、薬剤スクリーニングなどに有用である。しかし、iPSC-CMs は細胞内骨格や細胞代謝などが未熟であり、胎児に類似する事が知られており、臨床応用の際に制限となり得る。例えば解糖系は胎児心筋細胞において主要なエネルギー産生経路であるが、心筋細胞の成長と共にミトコンドリアでの代謝経路が成熟し、脂肪酸酸化が心臓の膨大なエネルギー供給を可能とする主要な代謝経路となる。我々は、iPSC-CMs を脂肪酸の基質とした培地で培養処理することで、iPSC-CMs が形態的、機能的、そしてエネルギー代謝に関して成熟心筋細胞様の特徴に変化するかどうか検討した。</p>			

材 料 ・ 方 法

36歳健康男性ドナー皮膚線維芽細胞、59歳健康男性ドナー末梢血単核細胞から樹立した2種類のヒト iPSC を使用した。心筋細胞への分化誘導開始から20日後の iPSC-CMs を乳酸の基質とする乳酸培地で7日間培養し、純化を行った。純化された iPSC-CMs を、脂肪酸を基質とする培地 (maturation medium) で3-7日間培養処理し、グルコースを基質とする培地 (control medium) と比較検討した。検討項目は、①心筋特異的マーカーの発現 (免疫染色、RT-qPCR、Western blot)、②細胞代謝プロファイリング (細胞外フラックスアナライザーXF96®) とし、細胞代謝プロファイリングでは、1) ミトコンドリア呼吸評価試験: オリゴマイシン (ATP 合成酵素阻害剤)、FC CP (ミトコンドリア脱共役剤)、アンチマイシン A (ミトコンドリア複合体阻害薬) を用いた酸素消費速度 (pmol/min/ μ g protein) の変化量、2) 解糖能評価試験: グルコース、オリゴマイシン、2-デオキシ-D-グルコース (2-DG, 解糖阻害剤) を用いた細胞外酸性化速度 (mpH/min/ μ g protein) の変化量を検討した。

成 績

純化を目的とした乳酸培地による7日間の培養処理によって、未処理 iPSC-CMs よりも高いトロポニン T 陽性率を得た (75% vs. 98%, $p < 0.05$)。Maturation medium による培養処理の結果、iPSC-CMs は control medium 群と比べ、伸長した細胞形態、ミトコンドリア数の増大、心筋特異マーカーの遺伝子・タンパク質発現の増大を示した。

細胞代謝プロファイリングでは、maturation medium 群は control medium 群に比べ、ミトコンドリアによる酸素消費速度から算出される基礎呼吸、ATP 産生量、最大呼吸能、予備呼吸能において有意に高かった ($p < 0.01$)。また、Maturation medium 群の iPSC-CMs は control medium 群に比べ外因的に前負荷したパルミチン酸に対する基礎呼吸、最大呼吸能の変化量が優位に高かった ($p < 0.05$)。このパルミチン酸に対する反応性は、脂肪酸のミトコンドリア内への輸送に重要な役割を担う CPT-1a (carnitine palmitoyltransferase- I a) 阻害因子である etomoxir (ETO) によって無効となったが、解糖阻害剤である 2-DG では阻害されなかった。これらの結果は、エネルギー代謝において maturation medium はミトコンドリア脂肪酸酸化能を成熟させ、maturation medium で培養処理した iPSC-CMs は成人心筋細胞様のエネルギー代謝に近づくことが示唆された。また、細胞外酸性化速度を計測することで解糖能を間接的に評価する解糖能評価試験では、maturation medium 群の iPSC-CMs は control medium 群に比して有意に高い解糖系呼吸、解糖能、予備解糖能を示した ($p < 0.05$)。更に、前負荷されたグルコースに対する細胞外酸性化速度は maturation medium 群で容量依存性に増加した。

これらの観察結果は、2種類のヒト iPSC から分化誘導させた iPSC-CMs において同等の結果を得た。

考 案

近年、iPSC-CMsの未熟性は幹細胞臨床応用の際の懸念事項となっている。前述の通り、iPSC-CMsは成人心筋細胞と比較して未熟であることが知られており、様々な点で胎児心筋細胞の性質と類似している。現時点では iPSC-CMs を成人心筋細胞と同等の性質に変化させる事は困難であるが、iPSC-CMsの臨床応用を成功するためには可能な限り成人心筋細胞の特性に近づける必要がある。今回我々は、iPSC-CMsを脂肪酸の基質とする培地で培養処理するという単純で簡便な方法で、形態学的、遺伝子・タンパク質レベルで成熟するだけでなくエネルギー代謝においてもミトコンドリア脂肪酸酸化能の促進を通じて成熟することを示した。

形態学的に iPSC-CMs は初期の胎児心筋細胞のように円形の形態を示す。心筋細胞は成長と共に伸長し、棒状の外観となる。我々は iPSC-CMs が maturation medium による培養処理で、細胞形態を成人心筋細胞様の伸長した棒状の外観へと変化させることを免疫染色で観察した。サルコメアは筋原繊維の最小構成単位であり、成人心筋細胞のサルコメアは高度に整列し組織化されている。しかし、iPSC-CMs の筋原繊維は方向性が一定しておらず、組織化されていない。免疫染色上、maturation medium 群では iPSC-CMs のサルコメアは整列し、かつ組織化されていることが分かった。その他にも、サルコメアを構成するタンパク質 (TNNT2、TNNI3、MYL2、MYL3、MYL4、MYH6、MYBPC3) の遺伝子発現は maturation medium 群で増大していた。これらの結果は、maturation medium が形態学的に iPSC-CMs を成熟した細胞へと促進させ、サルコメアに関連するタンパク質の発現を増大することで細胞骨格を成熟心筋細胞様に変化させていることが示唆された。

心筋細胞のエネルギー需要量は他の組織に比べ高く、成人心筋細胞は脂肪酸をエネルギー源とすることで ATP 産生を効率的に行う。胎児期の心筋細胞は主に解糖系をエネルギー産生の場としているが、時間と共にミトコンドリア脂肪酸酸化能が成長し脂肪酸をエネルギー源とするようになる。細胞外フラックスアナライザーXF96®を使用した細胞代謝プロファイリングのミトコンドリア呼吸評価試験の結果、iPSC-CMs は脂肪酸を基質とした maturation medium によって基礎呼吸、ATP 産生量、最大呼吸能、予備呼吸能いずれにおいてもグルコースを基質とした control medium よりも高値である事が示された。それらは maturation medium が iPSC-CMs を前述の細胞骨格の変化だけでなく、ミトコンドリア脂肪酸酸化能の成熟も促していることを示唆している。更に、外因的に前負荷されたパルミチン酸に対する反応性が maturation medium 群で優位に高かった事、反応性が ETO では阻害されたが 2-DG では阻害されなかった事は、iPSC-CMs がエネルギーを解糖系からではなくミトコンドリアでの脂肪酸酸化から得ていることを示している。また、解糖能評価試験では解糖系呼吸、解糖能、予備解糖能はいずれも maturation medium 群で高く、グルコースに対する反応性が容量依存性に増加した。これらの結果は、Maturation medium で培養処理した iPSC-CMs が、例えば飢餓の時のように心筋細胞のエネルギー源が脂肪酸からグルコースへ変化した際に、エネルギー産生経路を脂肪酸酸化から解糖系へと柔軟に切り替えることが出来る能力を持つ事を示唆している。

胎児心筋や iPSC-CMs の解糖系から脂肪酸酸化への代謝経路の変化のメカニズムは現在の所一部しか解明されていない。Huらは HIF1 α (hypoxia-inducible factor 1 α) と LDHA (lactate dehydrogenase A) が iPSC-CMs の形態的、代謝、機能的な成熟に関わっていると報告している。HIF1 α と LDHA を阻害することでサルコメア長は伸長、ミトコンドリア DNA の発現量増大、細胞代謝プロファイリングにおけるミトコンドリア呼吸能は増大し、それらの結果は我々の実験結果と類似していた。その他にも PPAR α (peroxisome proliferator activated receptor α) がメカニズムに関与しているという報告もあるが、正確なメカニズムの解明には更なる検討が必要である。しかしながら、脂肪酸による培養処置が iPSC-CMs のミトコンドリアにおける脂肪酸酸化を促進するという我々の検討結果は、今後の iPSC-CMs の幹細胞臨床応用、疾患モデル作成、薬剤スクリーニングなどに重要な意味を持つと考えられる。

結 論

iPS 細胞由来心筋細胞は、脂肪酸培養処理によりミトコンドリア脂肪酸酸化能を促進させることで脂肪酸利用能を向上させ、成熟心筋様のエネルギー代謝へ変化した。

引 用 文 献

1. Drawnel, F.M.; Boccardo, S.; Prummer, M.; Delobel, F.; Gra_, A.; Weber, M.; Gerard, R.; Badi, L.; Kam-Thong, T.; Bu, L.; et al. Disease modeling and phenotypic drug screening for diabetic cardiomyopathy using human induced pluripotent stem cells. *Cell Rep.* **2014**, *9*, 810–821.
2. Hu, D.; Linders, A.; Yamak, A.; Correia, C.; Kijlstra, J.D.; Garakani, A.; Xiao, L.; Milan, D.J.; van der Meer, P.; Serra, M.; et al. Metabolic Maturation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes by Inhibition of HIF1 α and LDHA. *Circ. Res.* **2018**, *123*, 1066–1079.
3. 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. USA* **2012**, *109*, E1848–E1857.

参 考 論 文