

臨床グレードのヒトiPS細胞由来心筋細胞における シングルセル解析と再生医療への応用



慶應義塾大学医学部循環器内科 特任講師 遠山 周吾

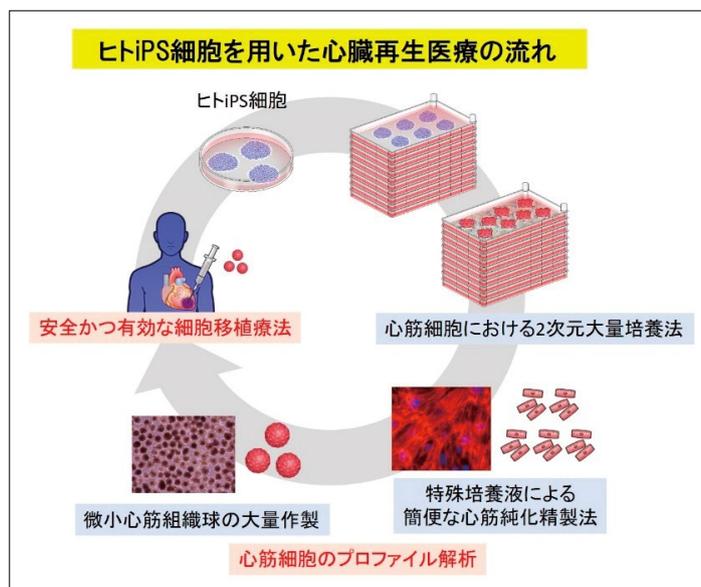
1. 研究目的

ヒトiPS細胞は再生医療における魅力的な細胞源ですが、再生医療を実現化するには克服すべき課題があります。1つは、分化後の細胞中に残存未分化幹細胞や増殖細胞が混入することによる腫瘍化リスクであり、もう1つは移植細胞が様々な種類の心筋細胞から構成されていることによる心室性不整脈のリスクです。

前者に関しまして、私たちは個々の細胞における代謝特性を利用することにより、特殊な培養液を用いて残存未分化幹細胞や増殖細胞を除去し心筋細胞のみを純化精製

する技術を確認することにより克服することに成功しました (Tohyama S, Cell Stem Cell 2013, Stem Cells Transl Med 2014, Cell Metabolism 2016)。しかしながら、後者の心筋細胞の多様性と不整脈の関係に関しましては、これまで電気生理学的解析が主であり、どのようなタイプの心筋細胞が存在しているかに関する詳細な報告はほとんどありませんでした。

そこで本研究では、ヒトiPS細胞から作製した心筋細胞における1細胞の遺伝子プロファイルを詳細に解析し、その結果を応用することにより安全かつ有効な細胞移植療法を確立することを目的として研究を行いました (上図)。



2. 研究成果

まずはじめに、ヒトiPS細胞から心筋細胞を分化誘導および純化精製を行いました。ヒトiPS細胞に対してGSK3 β 阻害剤およびWnt阻害剤の段階的な投与により心筋細胞への分化誘導を行い (Tohyama S, Cell Metabolism 2016)、分化誘導効率をflow cytometryにより評価しましたところ、心筋細胞の分化誘導効率は約80%でした。また、グルコースおよびグルタミンを含まず乳酸を添加した特殊な培養液により純化精製したところ純度は99%であり、これまでの成果と一致した結果でした (Tohyama S, Cell Metabolism 2016, Stem Cell Reports 2017)。

次に、純化精製後のヒトiPS細胞由来心筋細胞におけるプロファイルを免疫染色および1細胞RNAシーケンス解析を行ったところ、純化精製後の心筋細胞の95%がMLC2v陽性の心室筋細胞であり、ペースメーカー細胞と思われる細胞はほとんどいないことを確認しました。

さらに、作製した純化精製心筋細胞を免疫不全マウスの心臓に移植し、4か月後に移植心筋細胞における心室筋細胞の含有率を免疫染色により評価しましたところ、99%以上がMLC2v陽性の心室筋細胞であり、MLC2a陽性細胞においてもMLC2vを発現していることから、これらの心筋細胞は幼若な心室筋細胞であることが明らかとなりました(右図A)。

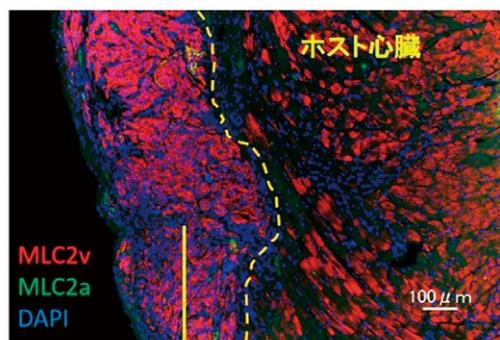
また、マイクロミニブタにおいて心筋梗塞モデルを作成した後、免疫抑制剤投与下においてヒトiPS細胞由来の心室筋細胞を約1億細胞移植し(右図B)、心機能をMRIにより評価しましたところ、2か月後に有意に心機能が改善していることを確認しました。

不整脈に関しましても解析しましたところ、心室性不整脈が移植直後には出現したものの、致死性の不整脈は認めず、心室性不整脈も2週間以降はほとんど出現しないことがわかりました。一方で、ブタではヒト細胞の長期生着が極めて困難であることが明らかになったため、今後は細胞生着可能なモデル動物を用いて不整脈の解析を行うことにより、細胞のプロファイルと催不整脈作用の関係を明らかにしていきたいと考えています。

3. 謝 辞

最後になりましたが、本研究を行うにあたりご支援をいただきました公益財団法人難病医学研究財団、およびご寄付をいただきました多くの皆様に厚く御礼を申し上げます。

生着した移植心筋細胞の99%以上が心室筋細胞である



生着した
移植細胞塊

ブタ心筋梗塞モデルへのヒトiPS由来心筋細胞移植

