

学位論文要旨

氏名 高岡 奈那子



論文題目

Hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells can differentiate into beating cardiomyocyte sheets and cardiomyocyte subtypes (atrial and ventricular cardiomyocytes)

(毛包幹細胞由来心筋シートの作成と、心房筋・心室筋細胞の分化誘導方法の確立)

指導教授承認印

天羽 康之



Hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells can differentiate into beating cardiomyocyte sheets and cardiomyocyte subtypes (atrial and ventricular cardiomyocytes)

(毛包幹細胞由来心筋シートの作成と、心房筋・心室筋細胞の分化誘導方法の確立)

氏名 高岡 奈那子

【背景】

心疾患は世界的にも死因の上位を占める。大量に心筋細胞を欠落すると心機能は著しく低下するが、心筋細胞はほとんど増殖能がなく、自己回復は臨めない。有効な治療法は少なく、重症例は心臓移植に頼っている現状だが、深刻なドナー不足により、心臓移植の件数にも限度がある。そのため、新規治療薬や再生医療に期待が高まっている。さらに、心房筋・心室筋のように分化した心筋細胞を作成することは、心筋サブタイプに関連する疾患へのアプローチに有用である。

Embryonic stem cells (ESC) や induced pluripotent stem cells (iPSC) を心筋細胞に分化誘導するプロトコルは公開されているが、倫理面や腫瘍化を考慮する必要があり、臨床応用の障壁となっている。一方、成体幹細胞由来心筋細胞の自家移植では、それらの問題を考慮する必要がないが、前述の幹細胞に比し、分化誘導法の十分な検討がなされていない。

当皮膚科学教室は、マウスの皮膚毛包バルジ領域と脂腺付着部位に分布しているネスチン陽性、ケラチン 15 陰性の毛包幹細胞を発見し、さらにマウス毛包幹細胞が角化細胞・神経細胞・グリア細胞・色素細胞・脂肪細胞・平滑筋細胞・心筋細胞に分化可能な多分化能を持つ成体幹細胞であることを明らかにした。

本研究では、心臓移植に代わる心疾患治療法の開発を目的とし、ラット毛包幹細胞から拍動する心筋シートの作成を試みた。さらに、ラット毛包幹細胞から、機能の異なるサブタイプ別の心筋 (心房筋・心室筋細胞) への選択的分化誘導を行い、疾患により特化した創薬や再生医療の開発を試みた。

【方法】

1) ラット毛包幹細胞の多分化能確認

F344/jcl ラット上唇髭毛包を採取し、毛包幹細胞領域を含む毛包上部を 10% FBS DMEM で 28 日間培養した。増殖した細胞が、角化細胞・神経細胞・グリア細胞・色素細胞・平滑筋細胞・心筋細胞に分化することを証明するため、それぞれの細胞に特異的な一次抗体と蛍光標識二次抗体を用いて免疫染色を行った。

2) ラット毛包幹細胞由来心筋細胞の培養条件の検討

ラット上唇髭毛包上部をガラスボトムシャーレに固定し、コントロール群は 10% FBS DMEM のみ、イソプロテレノール単独群は、10% FBS DMEM に isoproterenol のみを添加、4 種添加群は、10% FBS DMEM に isoproterenol、activin A、bone morphogenetic protein 4 (BMP4)、basic fibroblast growth factor (bFGF) を添加し、それぞれ 21 日間培養した。

得られた心筋細胞に対し、抗 cardiac troponin I (cTnI) 抗体を用いた免疫染色、Image J を用いた心筋量・心筋長の画像解析を行った。

3) ラット毛包幹細胞由来心筋シートの作成

ラット上唇髭毛包上部を 1.5、2.0、2.5、そして 3.0 mm 間隔でガラスボトムシャーレに固定し、10% FBS DMEM に isoproterenol、activin A、BMP4、bFGF を加え、計 28 日間培養した。心筋シートが得られるまでの期間と、シート形成率、シート面積を測定し、得られた心筋シートを抗 cTnI 抗体で免疫染色した。

4) ラット毛包幹細胞由来心房筋・心室筋細胞の分化誘導

ラット上唇髭毛包上部をガラスボトムシャーレに固定し、10% FBS DMEM に isoproterenol、activin A、BMP4、bFGF を加え、更に cyclosporin A (CSA) を添加し、21 日間培養することで心房筋細胞誘導を、Stem pro34 に activin A、BMP4、bFGF を加え、更に inhibitor of Wnt production-4 (IWP4) と vascular endothelial growth factor (VEGF) を

添加し、21 日間培養することで心室筋細胞誘導を試みた。コントロール群は、10% FBS DMEM のみで 21 日間培養した。心房筋・心室筋細胞への選択的分化を証明するため、myosin light chain 2a (MLC2a) や、myosin light chain 2v (MLC2v) のたんぱく質ならびに遺伝子発現を、免疫染色やリアルタイム RT-PCR で確認した。また、心筋細胞、心房筋細胞、心室筋細胞の構造を、抗 β -catenin 抗体を含む免疫染色や、透過型電子顕微鏡で確認した。さらに、心筋細胞拍動に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

【結果】

1) ラット毛包幹細胞の多分化能の確認

免疫染色により、ラット毛包幹細胞由来の細胞が、角化細胞・神経細胞・グリア細胞・色素細胞・平滑筋細胞・心筋細胞に分化していることを確認し、ラット毛包幹細胞の多分化能を証明した。

2) ラット毛包幹細胞由来心筋細胞の培養条件の検討

各種培養条件下で、抗 cTnI 抗体陽性の心筋細胞が得られた。心筋量・心筋長は、コントロール群に比し、イソプロテレノール単独群と 4 種添加群が有意に多く、有意に長かった。コントロール群、イソプロテレノール単独群はシート形成に至らず、4 種添加群のみ心筋シートを呈した。

3) ラット毛包幹細胞由来心筋シートの作成

ガラスボトムシャーレに固定した 4 種添加群は、培養 14 日目に、抗 cTnI 抗体陽性の拍動する心筋シートを形成した。毛包間隔 2.0 mm 固定培養が、短期間でより大きい拍動する心筋シートを形成した。

4) ラット毛包幹細胞由来心房筋・心室筋細胞の分化誘導

各種培養条件下で得られた細胞の免疫染色では、心房筋誘導群において cTnI / MLC2a 陽性の心房筋細胞が、心室筋誘導群において cardiac troponin T (cTnT) / MLC2v 陽性の

心室筋細胞が認められた。コントロール群の心筋細胞は、抗 cTnI 抗体ならびに抗 cTnT 抗体のみ陽性の心筋細胞であった。リアルタイム RT-PCR では、コントロール群と比較し、心房筋誘導群で *MLC2a*、心室筋誘導群で *MLC2v* 遺伝子発現量の有意な増加が認められた。透過型電子顕微鏡像では、コントロール群の心筋細胞は明瞭なサルコメア構造が見られなかった。一方で、心房筋・心室筋細胞には規則的なサルコメア構造が見られた。さらに、心室筋細胞では T 管様構造ならびに β -catenin 陽性の介在板が確認された。カルシウムイメージングでは、いずれの条件下の心筋細胞も、自発的な拍動に合わせて細胞内 Ca^{2+} 濃度が変化した。心房筋・心室筋細胞では、それぞれ特徴的な波形が見られた。心房筋細胞は、脱分極後に速やかに再分極相に移行し、心室筋細胞で観察されるよりも高い頻度で自発的な活動を示した。心室筋細胞は、急速な活動電位のアップストロークと、再分極相へのゆるやかな移行を示した。心房筋・心室筋細胞は、コントロール群の心筋細胞と比較し、活動電位の持続時間のばらつき、活動電位の大きさのばらつき、静止膜電位のばらつきが有意に小さく、規則的な活動を示した。

【考察】

本研究結果から、ラット毛包幹細胞由来心筋細胞は、ESC や iPSC 由来心筋細胞のような紡錘形や星形の細胞ではなく、長く伸びた多核化した心筋線維を形成し、それらが機能的合胞体として拍動しており、成体心筋により近い構造を持つという特徴が確認できた。また、機能的合胞体を含む心筋シートの作成に成功したことにより、長い心筋線維の形状を維持しながら、心臓移植などの臨床応用へ繋げる研究の基盤を整えることに成功した。

心房筋・心室筋細胞に関しては、ESC や iPSC では、すでにサブタイプ別の心筋細胞を分化誘導するプロトコルがいくつか公開されているが、成体幹細胞由来のサブタイプ別の心筋作成は今までに報告がなく、十分な検討がなされていなかった。今回、我々

は世界に先駆けて、成体幹細胞由来心房筋・心室筋細胞の分化誘導を証明した。

成体幹細胞である毛包幹細胞は、ESC や iPSC の抱える倫理面や拒絶反応の問題を考慮する必要がなく、腫瘍化のリスクも非常に低いため、高い安全性が期待できる。また、凍結保存や自家移植が可能なことから、臨床応用の可能性が高い。これらの優れた性質から、毛包幹細胞を用いた再生医療研究は、独創性・実現性が非常に高いと考える。

【結論】

ラット毛包幹細胞から、拍動する心筋シートの作成と、サブタイプ別の心筋(心房筋・心室筋細胞)の分化誘導方法の確立に成功した。

これらの成果により、毛包幹細胞を用いた再生医療の臨床応用の実現性は一層高まり、また、心筋サブタイプ別の心毒性スクリーニングや、創薬に関わる研究の促進が期待できる。