

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	市村 創
論文審査担当者	主 査 清水 公 裕 副 査 伊 藤 研 一・新 藤 隆 行・小 野 稔 (東京大学)
論 文 題 目	Increased predominance of the matured ventricular subtype in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in vivo (生体内において ES 細胞由来心筋細胞の成熟した心室筋分画が増加する)
(論文の内容の要旨)	<p>〔背景と目的〕</p> <p>現在、多能性幹細胞由来心筋細胞 (PSC-CM) の移植による小動物および大動物の心筋再生研究が、我々を含めた多くの研究室で行われている。これまでの研究から、障害心筋の移植心筋による置換、また大動物モデルにおける移植心筋と宿主心筋の電気的結合が得られることが明らかになっている。しかしながら、カンクイザルおよびブタにおける PSC-CM 移植モデルにおいて、心筋細胞移植後に出現する心室性不整脈が、臨床応用にむけての問題となっている。我々の研究で、カンクイザルにおける移植後不整脈は移植後 2 週間程度で出現し、移植後 12 週の時点では全て消失することがわかっている。移植後不整脈の原因としては、移植部位におけるリエントリーや、移植グラフトのもつ自動能が挙げられるが、近年の研究では自動能がその原因として有力視されている。PSC-CM 移植後不整脈は経時的に消失することがわかっていることから、この消失メカニズムは移植グラフトの何らかの変化が関与していると考えられる。そこで、その変化を観察することで、移植後不整脈が消失する原因を解明することを目的とした。</p> <p>〔方法と結果〕</p> <p>ヒト ES 細胞由来心筋細胞 (ESC-CM) を分化誘導し、トロポニン T 陽性率 98.7% の心筋細胞を得た。パッチクランプ法で、ESC-CM の電気的性質を確認したところ、8.9% が洞結節様 (Nodal-like)、残りが心室もしくは心房様の波形を示した。今回の実験では心室様、心房様心筋の区別はできず、併せて Working-type と表した。Nodal-like 心筋は、Working-type と比較して早い拍動数、立ち上がり速度をもち、APD90/APD50 比の高い心筋であることが確認でき、洞結節様と考えて矛盾しない結果であった。</p> <p>次に、動物実験を実施した。ヌードラットの左心室前壁に ESC-CM を直接注入法にて移植し、移植後 2 週、4 週、12 週で犠牲死させ、組織学的な変化を確認した。移植した ESC-CM はラット心室内に良好に生着し、移植後 12 週でグラフト面積が増大する傾向を認めた。移植した ESC-CM の成熟化を確認するため、MLC2a、MLC2v の免疫染色を行った。経時的に MLC2a 陽性細胞の割合は有意に減少し、MLC2v 陽性細胞の割合は有意に増加した。また、洞結節特異的マーカーである SHOX2、TBX3、HCN4 陽性細胞の割合の変化も確認したところ、いずれも経時的に陽性細胞が減少していることが確認された。特にグラフトに占める SHOX2、TBX3 陽性細胞の割合は経時的に減少し、移植後 12 週で有意に減少することが確認出来た。このことから、グラフト内の洞結節様心筋の割合が経時的に減少していると判断できる。同期間の In vitro での細胞の変化を確認するため、2 週、4 週、12 週間の平面培養の後、培養心筋細胞の細胞免疫染色を行った。MLC2a および MLC2v の割合は In vivo での結果と同様に MLC2v 陽性細胞の割合が増加している所見を認め、また HCN4、TBX3 については減少傾向を認めたが、SHOX2 陽性細胞については In vivo の結果と異なり減少を認めなかった。続いて、より移植後の状態に近い In vitro モデルとして 3 次元培養を同期間行い、免疫染色を実施したところ、HCN4、SHOX2、TBX3 いずれも減少傾向を認めなかった。</p>

In vivo で経時的に Nodal-like 心筋分画の減少が生じる原因が各分画に分裂能力の差がある可能性を考え、SHOX2 および TBX3 と KI-67 の多重免疫染色を行った。その結果、SHOX2 および TBX3 陽性細胞における KI-67 陽性細胞の割合は経時的に減少し、移植後 2 週間で有意な差となった。他の細胞増殖タンパクとして Anillin を用いての免疫染色を行ったが、そもそも Anillin の発現が非常に乏しいことにより、有意な差はみられなかった。

In vivo での移植グラフトおよび In vitro での 2 次元培養細胞に対する RNA シークエンスも行った。PCA 分析で In vitro と In vivo の間には明確な差を認め、In vivo では移植後 12 週にでより成人心筋に近い傾向を認めた。また、移植後 12 週で心筋成熟化マーカーである TNNI3、MYL2 (MLC2V)、MYH7 の発現が、移植前細胞と比較し有意に増加し、洞結節細胞のマーカーである ISL1、CACNA1H、TBX18 については有意に減少していた。

[まとめと考察]

今回の実験の結果、ESC-CM の 1 割程度に Nodal-like 心筋が混在しており、その拍動数はヒト心拍数より早いことが明らかとなった。このことから、Nodal-like 心筋の混在が PSC-CM 移植後不整脈の原因となっている可能性があると考えられる。また、SHOX2、TBX3、HCN4 陽性細胞の割合は、移植後 12 週で有意に減少しており、これは移植後不整脈の消失する時期と一致していた。さらに、SHOX2 陽性細胞の KI-67 陽性率は、SHOX2 陰性細胞のものよりも低く、このことが移植後不整脈が自然に消失する原因になっている可能性がある。しかしながら、今回の実験では ESC-CM の経時的な成熟化がみられており、Working-type 心筋も拍動数は遅いものの自動能を持っていたことから、幼若な Working-type 心筋の自動能によって移植後不整脈が生じ、その成熟化によって不整脈が自然消失する、という可能性も否定できない。今後、さらなる実験によって移植後不整脈の原因が明らかになっていくことが期待される。