

令和 5年 9月

脇水孝之 学位論文審査要旨

主査 初 沢 清 隆
副主査 香 月 康 宏
同 白 吉 安 昭

主論文

SHOX2 refines the identification of human sinoatrial nodal cell population in the in vitro cardiac differentiation

(in vitro心筋分化においてSHOX2はヒト洞房結節細胞集団の純化を可能にする)

(著者：脇水孝之、森川久未、福村健太、幸哲寛、足立隆、倉田康孝、三明淳一郎、久留一郎、経遠智一、白吉安昭)

令和4年 Regenerative Therapy 21巻 239頁～249頁

参考論文

1. Esm1 and Stc1 as angiogenic factors responsible for protective actions of adipose-derived stem cell sheets on chronic heart failure after rat myocardial infarction

(ラット心筋梗塞後の慢性心不全における脂肪由来幹細胞シートの保護効果に關与する血管新生因子としてのEsm1とStc1)

(著者：渡邊莉比、堀江大夢、倉田康孝、井上裕美子、野津智美、脇水孝之、足立真彩、山本堅志郎、森川久未、桑原政成、坂口琢紀、森崎隆幸、三明淳一郎、西村元延、経遠智一、白吉安昭、伊藤慎、北風政史、二宮 治明、山本一博、久留一郎)

令和3年 Circulation Journal 85巻 657頁～666頁

2. *Lactobacillus gasser* PA-3 reduces serum uric acid levels in patients with marginal hyperuricemia

(*Lactobacillus gasser* PA-3は高尿酸血症患者において血清尿酸値を低下させる)

(著者：浜田紀宏、久留一郎、脇水孝之、加藤雅彦、後藤保、古賀敦朗、遠藤佑輔、谷口晋一、山本一博、二宮 治明、坪井洋、 山口真、山田成臣、狩野宏、浅見幸夫)

令和4年 Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids 41巻 361頁～369頁

3. Deep learning-based identification of sinoatrial node-like pacemaker cells from SHOX2/HCN4 double-positive cells differentiated from human iPS cells

(深層学習によるヒトiPS細胞由来SHOX2/HCN4共陽性洞房結節様ペースメーカー細胞の識別)

(著者：脇水孝之、内藤純平、石田学、倉田康孝、経遠智一、白吉安昭、久留一郎)

令和5年 Journal of Arrhythmia DOI : 10.1002/joa3.12883

学位論文要旨

SHOX2 refines the identification of human sinoatrial nodal cell population in the in vitro cardiac differentiation

(in vitro心筋分化においてSHOX2はヒト洞房結節細胞集団の純化を可能にする)

洞房結節 (SAN) 細胞は、その電氣的自動能によって心臓のペースメーカーとして機能している。SAN細胞の機能不全は洞不全症候群 (SSS) を引き起こし、徐脈性の不整脈は、機械式ペースメーカーの植え込みの治療が必要となる。しかし、ヒトSAN細胞の生理機能やSSSの病態生理に関する研究は、ヒトSAN細胞の入手が困難であるために、あまり進んでいなかった。ヒト人工多能性幹細胞 (iPS細胞) の登場により、心筋のような入手が困難である細胞の生理学的および病理学的研究が可能になったが、ヒトiPSCから分化誘導して得られる心筋細胞はSAN細胞や心房筋、心室筋などが混在する不均一な細胞集団であるため、分化誘導後の各種心筋細胞の純化・分類方法の確立が課題となっている。

Short stature homeobox 2 (SHOX2) 遺伝子とhyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel 4 (HCN4) 遺伝子は、SAN細胞に特異的に発現しており、SANの発生・分化と自律的拍動能の形成に重要な役割を持つ遺伝子であるとされている。本研究では、HCN4とSHOX2をSANマーカーとしてゲノム編集による蛍光標識をすることで、in vitroでヒトSAN様細胞を精製することを目的とした。

方法

ヒトiPS細胞を用いて、HCN4およびSHOX2遺伝子の発現をそれぞれ蛍光タンパク質EGFPおよびmCherryで可視化したHCN4-EGFP/SHOX2-mCherry二重レポーター細胞株を作製した。HCN4-EGFP標識にはバクテリア人工染色体(BAC)を用いたセミノックイン系を、SHOX2-mCherry標識にはCRISPR-Cas9を用いたノックイン系を用いて二重レポーター細胞株を樹立した。SAN様細胞を同定するために、フローサイトメトリー、RT-PCR、ホールセルパッチクランプによる電気生理学的解析を行った。各種心筋細胞 (心室筋細胞、心房筋細胞、SAN細胞) の分類には、電気生理学的解析時に計測された活動電位における活動電位持続時間比 (APD30-40/70-80 ratio) と、最大脱分極速度 (dV/dt_max) を用いて分類を行った。

結 果

フローサイトメトリー解析により、HCN4-EGFP単陽性細胞（HCN4+／SHOX2-細胞）と HCN4-EGFP／SHOX2-mCherry二重陽性細胞（HCN4+／SHOX2+細胞）が分離された。RT-PCR解析の結果、HCN4+／SHOX2+細胞内ではHCN4、SHOX2、ISL1、TBX18といったSAN関連遺伝子の発現が確認された。さらに、ホールセルパッチクランプ法での電気生理学的解析の結果、HCN4+／SHOX2+細胞の約70%が、最大速度と活動電位持続時間という活動電位パラメータで定義される、SAN細胞様の電気生理学的特性を示すことが明らかとなった。

考 察

HCN4+／SHOX2+細胞の約 70%がSAN細胞様の電気生理学的特徴を示し、in vitroでのSAN様細胞の濃縮が可能になった。しかし、残りの 30%の細胞はSAN様細胞ではなく、これは、HCN4-EGFP／SHOX2-mCherry二重レポーターヒトiPS細胞株を使用した精製の限界と考える。更なるヒトSAN様細胞の純化を行うためには、よりよいレポーター遺伝子の探索・搭載や、遺伝子以外でマーカーとなりえる物での標識に加え、根本的なヒトSAN細胞の理解と分化誘導方法の最適化を行う必要があると考える。また、SAN細胞に関しても近年、心臓の所属領域の違いにおける更なるタイプの分類が示されており、今後、単一細胞レベルでの遺伝子発現と活動電位の形状との関係性が明らかになれば、更なる細胞種の細分化やそれら細胞の持つ機能の解析に加え、純化方法の開発が可能になるだろう。

結 論

本研究で樹立されたHCN4-EGFP／SHOX2-mCherry二重レポーターヒトiPS細胞株を用いることで、分化誘導して得られた不均一な分化心筋細胞集団の中からSAN様の特性を示す細胞の濃縮が可能となった。単離されたHCN4+／SHOX2+細胞のうち、70%の細胞がSAN細胞様の生化学的および電気生理学的特性を示した。これらの結果からSHOX2がin vitro心臓分化におけるヒトSAN様細胞集団のさらなる純化に有用な遺伝子であると結論づける。将来的にこの細胞株は、新規候補薬剤の心毒性試験などの創薬や、ヒトiPS細胞由来の生物学的ペースメーカーの開発などの再生医療に有用である可能性があるかと期待される。