



2023年9月25日

報道関係者各位

慶應義塾大学医学部

培養上清 miRNA を用いた移植用心筋細胞の品質評価法を開発

—少量の培養液を調べるだけで細胞の状態を簡便に把握することが可能に—

慶應義塾大学医学部内科学教室（循環器）の遠山周吾専任講師、関根乙矢助教らの研究グループは、シスメックス株式会社および Heartseed 株式会社との共同研究で、培養上清中に分泌される様々な種類の micro RNA (miRNA) (注 1) を検出することにより、ヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞 (注 2) から移植用心筋細胞を作製する工程のモニタリング手法を確立しました。また、特徴的な miRNA 検出により、分化後に残存し、移植後に腫瘍化する可能性のある未分化幹細胞混入の有無を簡便に評価可能であることを示しました。本手法は心臓移植の代替医療として注目される、ヒト iPS 細胞を用いた心臓再生医療の発展に寄与するものです。

本研究成果は 2023 年 9 月 21 日（米国東部時間）に、国際学術誌 *Stem Cell Reports* のオンライン版に掲載されました。

1. 研究の背景

重症心不全患者の根本的な治療法は心臓移植のみですが、圧倒的にドナー不足であり、移植待機期間は延長の一途を辿っています。近年、心臓移植の代替治療として、ヒト iPS 細胞を用いた心臓再生医療が注目をされており、長年の研究の末、現在ヒトへの臨床応用が現実のものとなりつつあります。一方で臨床応用および産業化には様々な障壁があります。ヒト iPS 細胞から分化した後に未分化幹細胞が残存していると移植した際に腫瘍化する可能性があるため、残存未分化幹細胞の混入の有無を評価する必要があります。また、心筋細胞移植治療において必要とされる数億個の心筋細胞を作製するには多くのコストを要しますが、心筋細胞が効率よく作製できないケースもあり、その際には心筋細胞を作製した後に廃棄することになってしまうため、無駄なコストを抑えるためにも、培養早期の段階で心筋細胞が作製できるか否かを簡便に評価する方法が求められていました。しかしながら、従来の品質評価法は、主に移植用の貴重な細胞の一部を採取し、破壊した上で評価するものでした。

本研究グループはこれまでに多層培養プレートを用いて、ヒト iPS 細胞から一度に 10 億個以上の心筋細胞を含む細胞を分化誘導し（参考文献 1）、特殊な培養液や低分子化合物を用いて未分化幹細胞を除去し、心筋細胞のみを選別する手法を構築してきましたが（参考文献 2,3,4）、本手法においても、一部採取のために、すべての細胞を一度培養皿から剥がす必要があります。また一部の細胞の評価では他の移植用細胞に未分化幹細胞が混入している可能性も否定できないため、細胞を破壊することなく全体の細胞の品質を評価する手法の開発が求められていました。

そこで、研究グループは、細胞内で作られ、細胞外に分泌される 20~25 塩基の短い non coding RNA である miRNA に着目しました。miRNA は、細胞の分化状態に応じて発現する種類が変化することから、廃棄する培養上清中に存在する特徴的な miRNA を同定し、検出することにより、移植用心筋細胞の品質評価が可能ではないかと考え、ヒト iPS 細胞から中胚葉、心筋分化、成熟化に至る各段階において細胞外に分泌される特徴的な miRNA を同定し、少量の培養上清からそれらを検出することを目指して研究を実施しました。

2. 研究の成果

(1) ヒト iPS 細胞から中胚葉・心筋分化および成熟過程における培養上清の miRNA アレイ解析

まず、ヒト iPS 細胞から心筋細胞を作製する過程における培養上清中の miRNA に関する網羅的な miRNA アレイ解析を行い、未分化幹細胞の状態、中胚葉の状態、幼若な心筋細胞の状態、成熟した心筋細胞の状態において培養上清中に分泌されている特徴的な miRNA を同定しました。分化誘導開始を 0 日目として、培養上清サンプルは -1 日目（開始前日）、3 日目、5 日目、7 日目、9 日目、21 日目、35 日目、51 日目に採取しました（図 1A）。ヒートマップ（注 3）と主成分分析（注 4）が示すように、培養上清に分泌された miRNA プロファイルは、中胚葉分化、心筋分化、成熟化の過程において経時的に大きく変化していました（図 1B, 図 1C）。そこで、中胚葉・心筋分化および成熟過程のモニタリング、さらには残存未分化幹細胞の検出に有用な miRNA を同定するために、2 つの特定の時点における各 miRNA の発現比率を評価しました。-1 日目に対する 3 日目の比率が高い miRNA は中胚葉分化のマーカーとして、-1 日目に対する 7 日目（または 9 日目）の比率が高いものは心筋分化のマーカーとして、9 日目（または 21 日目）に対する 51 日目の比率が高いものは心筋成熟化のマーカーとして、9 日目（または 21 日目）に対する -1 日目の比率が高いものは iPS 細胞由来心筋細胞中に残存する未分化幹細胞のマーカーとして抽出しました。各過程で最も比率の高い miRNA の中から、中胚葉分化マーカーとして miR-489-3p、心筋分化マーカーとして miR-1-3p と miR-133a-3p、心筋成熟化マーカーとして miR-208b-3p、let-7b-5p、let-7c-5p、残存未分化幹細胞のマーカーとして miR-302b-3p を選択しました（図 1D）。

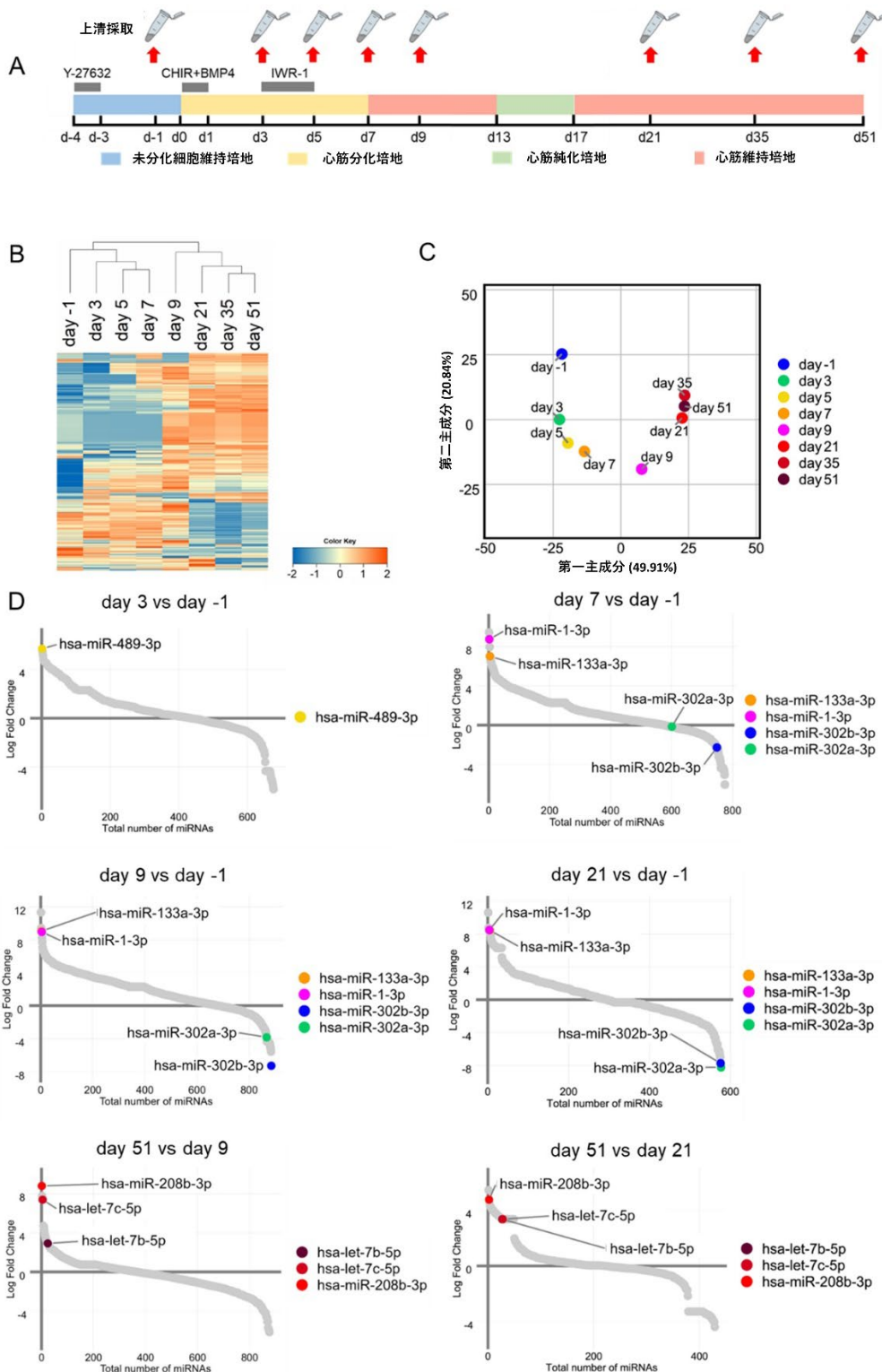


図 1

- A. ヒト iPS 細胞から心筋細胞を作製する工程における培養上清採取のタイミングを示しました。
- B. 心筋分化の過程で上清中に検出された全ての miRNA の発現レベルの変化を示すヒートマップを示しました。
- C. 心筋分化の過程で上清に分泌される miRNA のプロファイルの段階的変化を示す主成分分析を示しました。
- D. 特定の 2 つの時点における上清中の各 miRNA の発現比から、各マーカー候補となる miRNA を選出しました（検出された全 miRNA を左から発現比の高い順に並べました。縦軸は発現比の対数を取った値です）。

(2) ヒト iPS 細胞から中胚葉分化のモニタリング

miR-489-3p が中胚葉分化のモニタリングに用いられるかを調べるために、ヒト iPS 細胞から中胚葉分化および心筋分化を行う際に上清中に分泌される miR-489-3p の量を RT-qPCR (注 5) を用いて測定しました。中胚葉分化の有無をコントロールするために、分化誘導に必要な GSK3B 阻害剤 (CHIR99021)、骨形成タンパク質 (BMP) 4 を分化誘導開始日に添加する群 (グループ H) としない群 (グループ L) に分けました。中胚葉分化を確認するため、中胚葉マーカーである Brachyury T の免疫蛍光染色を行いました。その結果、グループ H ではほぼすべての細胞が Brachyury T に陽性で中胚葉分化が確認されましたが、グループ L では陽性細胞は認めませんでした (図 2A)。その上で、分化過程における上清中の miR-489-3p の発現量は、グループ H では 3 日目に急激に増加しましたが、グループ L では増加は見られませんでした (図 2B)。また、外胚葉分化の代表として、ヒト iPS 細胞から神経細胞への分化を行ったところ、神経分化過程では miR-489-3p の上昇は観察されないことが確認されました (図 2C)。さらに、他の中胚葉細胞系の細胞として、ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞の分化誘導を行ったところ、分化後 3 日目に miR-489-3p は有意に上昇することがわかりました (図 2D)。これらの結果は、miR-489-3p が中胚葉分化のモニタリングに有用であることを示していると言えます。

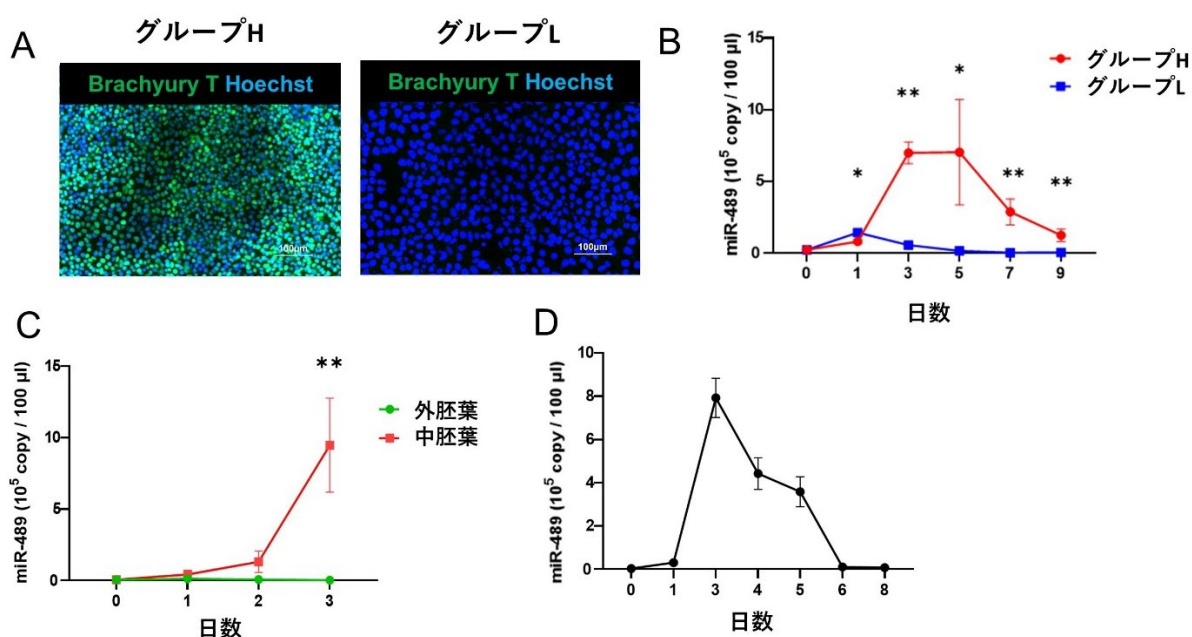


図 2

- A. 2 群における、中胚葉分化の有無を Brachyury T の免疫染色により示しました。
- B. 2 群における心筋分化過程での培養上清中の miR-489-3p の発現量の経時的変化を示しました。
- C. 中胚葉 (心筋細胞) 分化過程、外胚葉 (神経細胞) 分化過程での培養上清中の miR-489-3p の発現量の経時的変化を示しました。
- D. 内皮細胞分化過程での培養上清中の miR-489-3p の発現量の経時的変化を示しました。

(3) ヒト iPS 細胞から心筋細胞を大量培養する際のモニタリング

大型多層培養プレートを用いて、ヒト iPS 細胞から心筋細胞を分化誘導し、上清中の miR-1-3p と miR-133a-3p のレベルを測定することにより、心筋分化効率の良し悪しが判定できるか否かを評価することにしました。そこで、ヒト iPS 細胞から心筋細胞を大量培養す

る際に培養上清のサンプリングを行い（図 3A）、フローサイトメトリーで心筋トロポニン T（cTnT）陽性細胞の割合を測定し、分化効率が高い群（グループ高：90%以上、 $94.8 \pm 3.0\%$ ）と低い群（グループ低：65%未満、 $49.1 \pm 13.3\%$ ）の 2 群に分けました（図 3B）。培養上清中の miR-1-3p および miR-133a-3p の発現を評価したところ、グループ高では分化 7 日目に有意に上昇する一方で、グループ低では明らかな上昇が認められませんでした（図 3C）。心筋分化効率と 7 日目の上清中の miR-1-3p および miR-133a-3p の発現レベルとの相関の決定係数は、それぞれ 0.7466 および 0.7216 であり、強い相関を示していました。このことから、大量培養系においても、分化誘導開始後の早い段階で、心筋分化の良し悪しを非破壊的に区別できることが示唆されました（図 3D）。

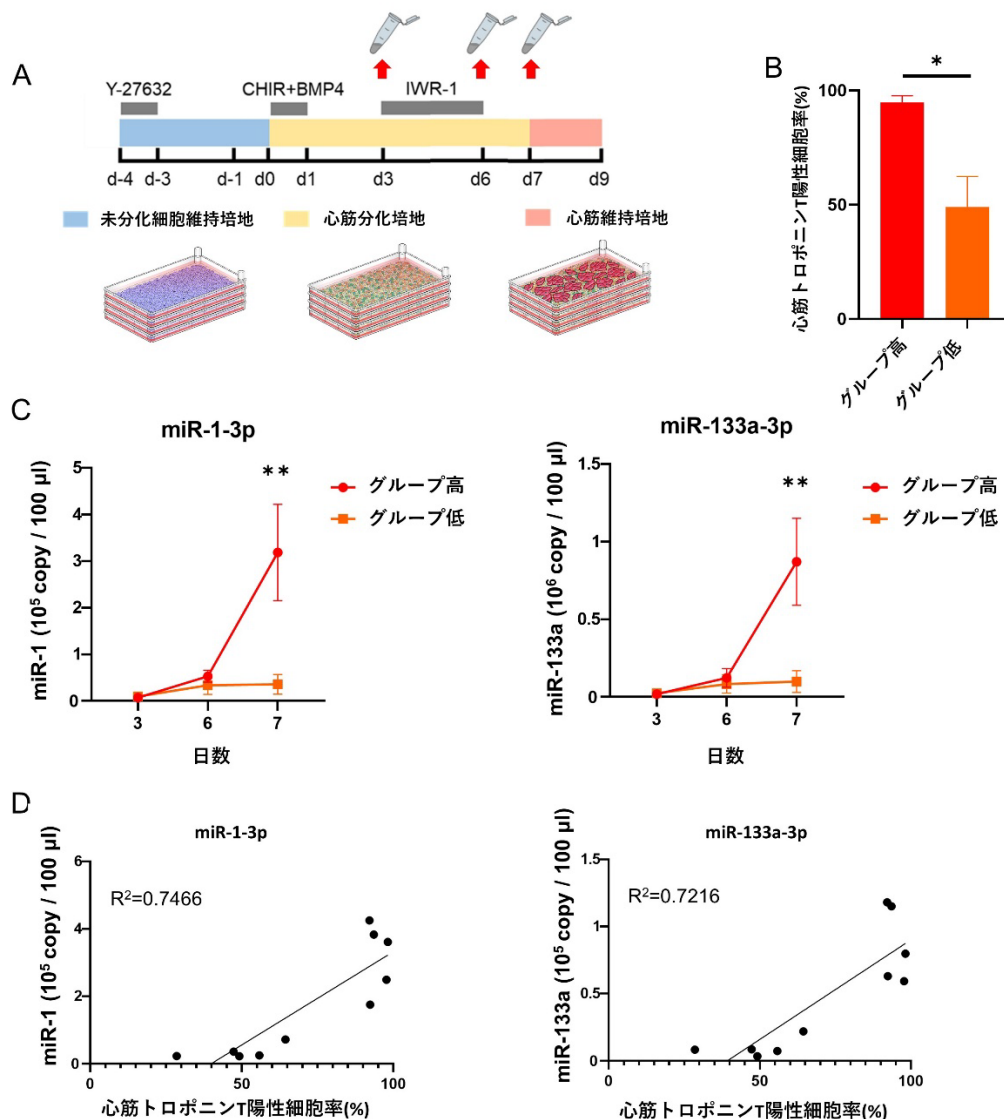


図 3

- A. 大型多層培養プレートにおける心筋分化過程を示しました。
- B. 2 群における心筋分化効率を、cTnT 陽性率をフローサイトメトリーで測定することで測定しました。
- C. 2 群における心筋分化過程での培養上清中の miR-1-3p, miR-133a-3p の発現量の経時的変化を示しました。
- D. 分化誘導開始 7 日目の培養上清中の miR-1-3p, miR-133a-3p の発現量と心筋分化効率の相関を示しました。

(4) 心臓成熟のモニタリング

ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞は、長期培養により成熟が促進されることが報告されていますが、実際に本研究グループでも、成熟関連マーカーの免疫染色と網羅的遺伝子解析を行い、心筋維持培地での長期培養後に心筋細胞が成熟プロファイルを示すことを確認しました (図 4A、4B)。次に、上清中の成熟関連 miRNA を同定するために、miRNA アレイのデータから候補分子として挙げられていた *let-7b-5p*、*let-7c-5p*、*miR-208b-3p* や、その他 *let-7* ファミリーにつき RT-qPCR を行いました。その結果、*let-7c-5p* の発現が最も経時的に顕著に増加し、また単調増加に近い傾向を示しました (図 4C、図 4D)。このことから成熟度を非破壊的に評価する方法として、上清中の *let-7c-5p* の測定が有用である可能性が示唆されました。

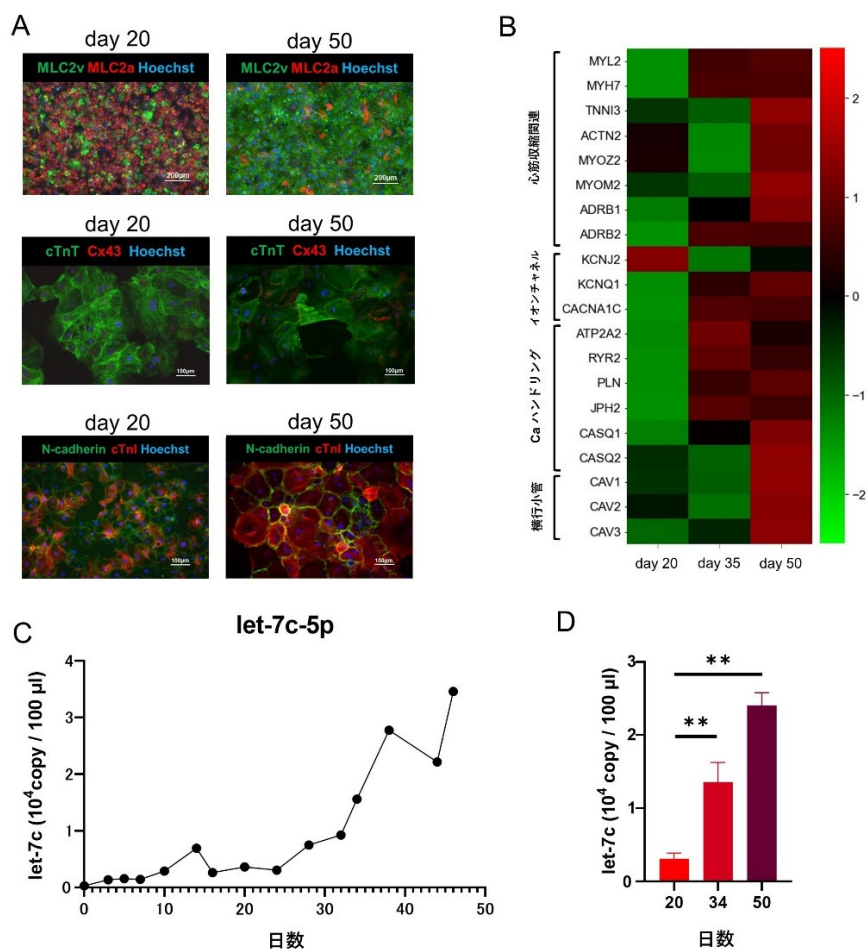


図 4

- A. 分化誘導後 20 日目と 50 日目の心筋細胞におけるミオシン軽鎖 2v (MLC2v) (緑) とミオシン軽鎖 2a (MLC2a) (赤)、cTnT (緑) とコネキシン 43 (Cx43) (赤)、N-cadherin (緑) と心筋トロポニン I (cTnI) (赤) の免疫染色を示しました。20 日目から 50 日目にかけて、MLC2a から MLC2v への移行、Cx43 や cTnI の発現の上昇や、N-cadherin で囲まれた細胞面積の増大が見られ、心筋の成熟化が確認されました。
- B. iPS 細胞由来心筋細胞の長期培養過程において分化誘導後 20 日目、35 日目、50 日目に発現した心臓成熟マーカーの転写産物のプロファイルをマイクロアレイによる網羅的解析を行い、転写発現レベルの変化をヒートマップに示しました。複数の成熟マーカーの発現上昇が確認されました。
- C. D. 分化誘導開始から 50 日目までの心筋細胞からの培養上清中に分泌される *let-7c-5p* の発現量を示しました。

(5) 残存未分化幹細胞の検出

分化誘導後 17 日目のヒト iPS 細胞由来心筋細胞に、心筋維持条件下でヒト iPS 細胞を 0%、0.01%、0.1%の濃度で播種して培養し、上清中の miR-302b-3p の発現を RT-qPCR で測定しました (図 5A)。miR-302b-3p は、0%播種の群でも 20 日目に上清中に検出されましたが、次第に定量限界以下まで減少しました。対照的に、0.01%または 0.1%播種した群では、miR-302b-3p は上清中に一貫して定量限界以上で検出されました (図 5B)。これと一致して、20 日目の免疫染色では、それぞれ未分化幹細胞に特異的なマーカーである OCT4 と SSEA4 陽性細胞は、0%播種群では検出されませんでした。0.01%播種群では検出されました (図 5C)。以上から、培養上清を採取し miR-302b-3p を測定することで非破壊的に残存未分化幹細胞の有無を検出できることが示されました。

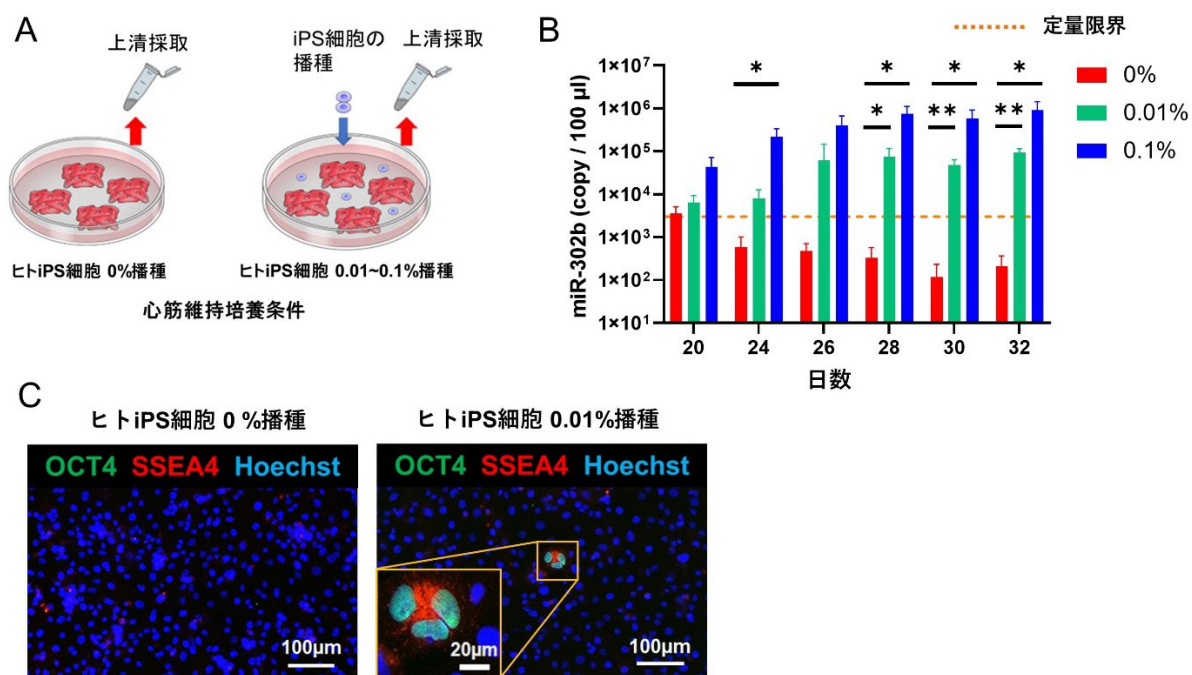


図 5

A. ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞へのヒト iPS 細胞の播種と、培養上清サンプリングの模式図を示しました。

B. 各濃度のヒト iPS 細胞を添加した心筋細胞の培養上清中の miR-302b-3p 発現の経時的変化を示しました。

C. 0%または 0.01%の iPS 細胞を播種した iPS 細胞由来の心筋細胞における OCT4 (緑)、SSEA4 (赤)、Hoechst (青) の免疫染色 (分化誘導開始から 20 日目で染色) を示しました。

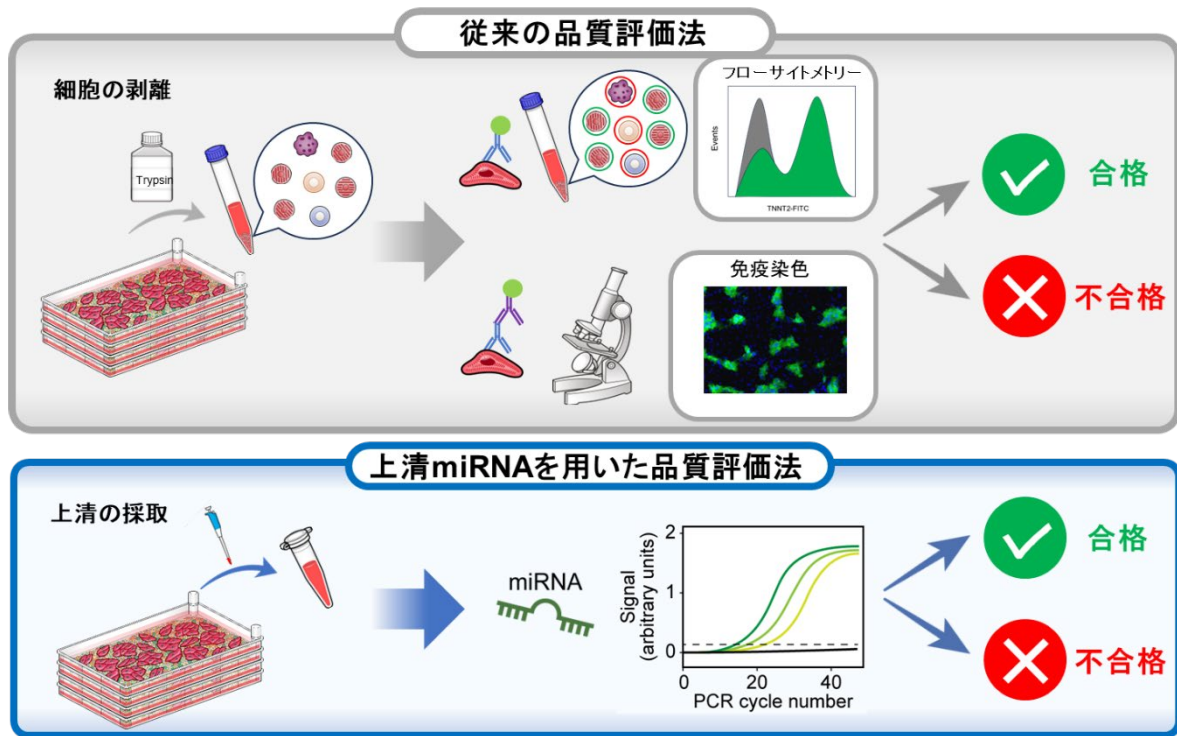


図 6

従来は細胞破壊的な品質評価法と、本研究で示した上清 miRNA を用いた非侵襲的な品質評価法の概略図を図示しました。

3. 今後の展開

研究グループは、培養上清中に含まれる各分化段階に特徴的な miRNA を検出することで、細胞を破壊することなく、廃棄する少量の培養上清を採取するだけで経時的に簡易に評価が可能で、また細胞全体の品質を評価することが出来ることに成功しました (図 6)。培養上清中の miRNA を用いた本手法は、製造におけるコスト削減のみならず、移植後の有効性や安全性の評価、あるいは他領域におけるヒト iPS 細胞由来の移植用細胞の品質評価への応用が期待されます。ヒト iPS 細胞を用いた心筋再生医療の臨床応用が現在、従来の治療では救命困難な多数の心不全患者の元へ、心筋組織移植が実際にスタンダードな医療として提供されるようになるためには、社会実装化・産業化、特に大規模心筋細胞製造における簡便な品質評価という点でまだ課題がありますが、本手法が心筋再生医療の発展に寄与するものと考えています。

4. 特記事項

本研究は、主に下記機関より資金的支援を受け実施されました。
 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム 再生・細胞医療・遺伝子治療研究開発課題 (基礎応用研究課題)「細胞外代謝環境スクリーニング系による高機能化オルガノイドの作製とその応用」
 地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所 (KISTEC) 戦略的研究シーズ育成事業「徐脈性不整脈の革新的細胞移植治療開発」
 JSPS 科研費 JP20H03768, JP20H05744, JP19H03660

5. 論文

英文タイトル : Seamless and Non-Destructive Monitoring of Extracellular MicroRNAs during Cardiac Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells

タイトル和訳 : ヒト多能性幹細胞から心筋細胞分化過程での経時的で非破壊的な細胞外 miRNA のモニタリング

著者名 : 関根 乙矢、金編さやか、増本 佳那子、相原 祐希、梅井 唯加、谷 英典、相馬 雄輔、梅井 智彦、芳賀 康太郎、森脇 大順、大野 昌利、岸野 喜一、金澤 英明、福田 恵一、家田 真樹、遠山 周吾

掲載誌 : *Stem Cell Reports*, 2023 (e-pub online)

DOI : 10.1016/j.stemcr.2023.08.011

【参考文献】

1. Tohyama, S., Fujita, J., Fujita, C., Yamaguchi, M., Kanaami, S., Ohno, R., Sakamoto, K., Kodama, M., Kurokawa, J., Kanazawa, H., et al. (2017) . Efficient Large-Scale 2D Culture System for Human Induced Pluripotent Stem Cells and Differentiated Cardiomyocytes. *Stem Cell Reports* 9, 1406-1414. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.08.025.
2. Tohyama, S., Hattori, F., Sano, M., Hishiki, T., Nagahata, Y., Matsuura, T., Hashimoto, H., Suzuki, T., Yamashita, H., Satoh, Y., et al. (2013) . Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell* 12, 127-137. doi: 10.1016/j.stem.2012.09.013.
3. Tohyama, S., Fujita, J., Hishiki, T., Matsuura, T., Hattori, F., Ohno, R., Kanazawa, H., Seki, T., Nakajima, K., Kishino, Y., et al. (2016) . Glutamine Oxidation Is Indispensable for Survival of Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Metab* 23, 663-674. doi: 10.1016/j.cmet.2016.03.001.
4. Tanosaki S, Tohyama S, Fujita J, Someya S, Hishiki T, Matsuura T, Nakanishi H, Ohto-Nakanishi T, Akiyama T, Morita Y, et al. (2020) . Fatty Acid Synthesis Is Indispensable for Survival of Human Pluripotent Stem Cells. *iScience* 23, 101535. doi: 10.1016/j.isci.2020.101535.

【用語解説】

(注1) microRNA (miRNA) : ゲノム上にコードされ、細胞内で多段階的な生成過程を経て最終的に20から25塩基長の微小RNAとなる核酸である。このmiRNAは、機能性のnon-coding RNA (タンパク質へ翻訳されないRNAの総称) に分類されており、ほかの遺伝子の発現を制御する事で、生命現象において重要な役割を担っている。

(注2) ヒト人工多能性幹細胞 (ヒトiPS細胞 : human induced pluripotent stem cell) : 体細胞に特定因子を導入することにより樹立される、胚性幹細胞 (ES細胞) に類似した多能性幹細胞。多能性を持つことから心筋細胞を含む様々な細胞への分化が可能であり、不全に陥った臓器への細胞・組織移植治療に用いるだけでなく、リソースが限られる心筋細胞を大量に作製して創薬研究に応用したり、遺伝性などの患者の特性を有する心筋細胞を培養皿上で作製することで疾患の研究に応用することも期待される。

(注3) ヒートマップ：2次元の行列型のデータを各々の数値の高低に応じて連続的な色調の変化で表し、視覚的に分かりやすく表示するデータの可視化手法の一つである。多変量データの高低パターンの似ているグループをクラスタリングした樹形図を隣に添えることもある。

(注4) 主成分分析：多くの変数を持つデータを集約してより少ない指標の合成変数（主成分）に要約する統計的分析手法である。次元の大きい多変量データを各変数を軸にとって視覚化することは困難であるが、情報をより少ない次元（主成分）に集約することでデータを視覚化する。主成分を与える変換の際、観測値の変化に対する説明能力を可能な限り各主成分に持たせる様に行われる。各主成分がデータ全体の中でどの程度の変動の割合を占めるかを統計学的・数学的に算出したものである寄与率は、第一主成分、第二主成分...の順に大きくなる。

(注5) qRT-PCR：リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用して核酸の定量を行う方法であり、遺伝子特異的な転写産物の存在量を測定することによって、様々な遺伝子の発現の増減を定量化することが可能になる。

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、厚生労働記者会、厚生日比谷クラブ、各社科学部等に送信しております。

【本発表資料のお問い合わせ先】

慶應義塾大学医学部内科学教室（循環器） 専任講師

遠山 周吾 （とおやま しゅうご）

TEL：03-5363-3446 E-mail：shugotohyama@keio.jp

【本リリースの配信元】

慶應義塾大学信濃町キャンパス総務課：飯塚・奈良・岸

〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35

TEL：03-5363-3611 FAX：03-5363-3612 E-mail：med-koho@adst.keio.ac.jp

<https://www.med.keio.ac.jp>