

# 博士論文

人工多能性幹細胞からの心筋分化誘導における  
STAT3 シグナル制御と人工キメラ受容体の応用  
(Application of artificial chimeric receptors to regulate  
STAT3 signaling for myocardial differentiation from  
induced pluripotent stem cells)

2021年3月

立命館大学大学院生命科学研究科  
生命科学専攻博士課程後期課程

塚本 輔

立命館大学審査博士論文

人工多能性幹細胞からの心筋分化誘導における  
STAT3 シグナル制御と人工キメラ受容体の応用  
(Application of artificial chimeric receptors to regulate  
STAT3 signaling for myocardial differentiation from  
induced pluripotent stem cells)

2021 年 3 月

March 2021

立命館大学大学院生命科学研究科

生命科学専攻博士課程後期課程

Doctoral Program in Advanced Life Sciences

Graduate School of Life Sciences

Ritsumeikan University

塚本 輔

TSUKAMOTO Tasuku

研究指導教員：川村 晃久 教授

Supervisor : Professor KAWAMURA Teruhisa

# 目次

略語.....	2
要旨.....	4
第1章 緒言	
1.1. 再生医学・再生医療と多能性幹細胞.....	6
1.2. 多能性幹細胞と STAT3 シグナル.....	10
1.3. 多能性幹細胞からの心筋分化誘導と G-CSF.....	15
1.4. 人工キメラ受容体と細胞制御.....	20
1.5. 本研究の意義と目的.....	22
第2章 実験方法と材料	
2.1. プラスミド構築.....	23
2.2. 細胞培養.....	27
2.3. iPS 細胞からの分化誘導とカルシウムイメージング解析.....	29
2.4. Western blotting.....	30
2.5. 免疫染色.....	31
2.6. 定量 RT-PCR.....	32
第3章 結果	
3.1. 人工 G-CSF キメラ受容体の設計と構築.....	35
3.2. 人工 G-CSF キメラ受容体下流におけるシグナル応答性解析.....	38
3.3. 人工 G-CSF キメラ受容体を介した心筋分化促進.....	43
3.4. 人工 G-CSF キメラ受容体導入 iPS 細胞に由来する心筋細胞の性状解析.....	45
第4章 考察	
4.1. 人工 G-CSF キメラ受容体の可能性.....	51
4.2. 人工キメラ受容体の応用について.....	56
4.3. 多能性幹細胞と再生医療の将来展望.....	59
第5章 結語.....	64
謝辞.....	65
参考文献.....	66

## 略語

BSA, bovine serum albumin

CAG, cytomegalovirus early enhancer/chicken  $\beta$  actin

CAR, chimeric antigen receptor

CRH, cytokine receptor homologous

EB, embryoid body

EpiS, epiblast stem

ES, embryonic stem cell

FL, fluorescein

FNIII, fibronectin type III

G-CSF, granulocyte colony stimulating factor

GCSFR, G-CSF receptor

GCSFRL, chimeric GCSFR with long extracellular domain

GCSFRS, chimeric GCSFR receptor with short extracellular domain

gp130, glycoprotein 130

Ig, immunoglobulin

IL, interleukin

iPS, induced pluripotent stem

IRES, internal ribosome entry site

JAK, Janus kinase

LIF, leukemia inhibitory factor

MAPK, mitogen-activated protein kinase

MEF, mouse embryonic fibroblast

MHC, myosin heavy chain

PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis

PBS, phosphate buffered saline

PI3K, phosphatidylinositol-3 kinase

scFv, single-chain variable fragment

SDS, sodium dodecyl sulfate

SMA, smooth muscle actin

STAT, signal transducer and activator of transcription

VE-Cad, vascular endothelial-cadherin

## 要旨

超高齢化を迎える社会にとって、健康寿命の延伸は喫緊の重要課題である。高度化する昨今の医療社会にあっても、心疾患に対する心筋再生のように、失われた生体組織に対する再生医療は次世代の治療体系として、その実用化に大きな期待が寄せられている。再生医療の要である幹細胞の中でも、医療応用面で大きな注目が寄せられているものの一つが、人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell：iPS 細胞）である。実際に、様々な種類の機能的な細胞が iPS 細胞から誘導され、医療への応用が検討されている。一方で、分化誘導の効率化と経済性の両立といった課題も多く残されており、その解決のためには iPS 細胞をはじめとする多能性幹細胞の、多能性の維持や分化といった過程における分子機構を解明し、それを制御することが必要である。

iPS 細胞の機能制御の多くを担う重要な分子機構として janus kinase (JAK) と signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 によるシグナル伝達経路が知られている。JAK/STAT シグナルは様々なサイトカインにより惹起されることが報告されているが、本研究では、心疾患に対する再生医療への応用を念頭に、心筋分化に重要な顆粒球コロニー形成刺激因子（granulocyte colony stimulating factor：G-CSF）とその受容体を介した制御機構に着目した。iPS 細胞からの分化誘導過程で G-CSF 刺激により、心筋分化誘導効率が促進される一方、医療応用に際しては G-CSF 組換えタンパク質調製のためのコストや供給の不安定さが懸念される。

そこで、本研究では、一本鎖抗体断片を含む人工 G-CSF キメラ受容体を構築し、これを iPS 細胞に導入することで、安価で化学的に安定な代替リガンドによる心筋分化誘導が可能であるか否かを検証した。さらに、心筋分化誘導効率は、各種心筋マーカー遺伝子の発現量と、自己拍動する胚様体の出現率から評価した。その結果、bovine serum albumin (BSA) に蛍光分子をコンジュゲートさせた代替リガンドを用いて、人工 G-CSF キメラ受容体を導入した iPS 細胞を刺激することにより心筋分化誘導効率の上昇が確認

された。また、蛍光イメージングにより、細胞内カルシウム濃度のオシレーションを呈する機能的な心筋細胞が誘導されたことも観察された。

本研究は、これまで細胞の増殖や遊走の制御といった分野で応用されてきた人工キメラ受容体を、iPS 細胞の分化誘導に応用した初めての研究であり、心筋分化誘導の安定性とコスト削減のために有用な基盤となり得る技術開発であると考えられる。iPS 細胞が抱える医療応用面での課題に多角的に寄与可能な成果であるといえる。

# 第1章 緒言

## 1.1. 再生医学・再生医療と多能性幹細胞

「再生医学」とは、疾病や傷害により欠損、あるいは変性した生体組織の再生に関わる科学的基盤を追求する医学分野であり、その成果を応用した臨床現場における医療は「再生医療」と呼ばれる。高度化する昨今の医療社会にあっても、失われた生体組織の再生は未だ大きなアンメットメディカルニーズであり、再生医療には次世代の治療体系として、その実用化に大きな期待が寄せられている。再生医療の本質は、組織・細胞のもつ自己修復力・再生能力の応用であるが、その実体として中心的役割を担うのが、幹細胞である。幹細胞とは、自己と同一の細胞を産生する自己複製能と、別種の細胞に分化できる分化能を併せもつ細胞であると定義される。再生医療とは、それら幹細胞の移植、ないし幹細胞から人工的に構築された組織の移植により、失われた人体機能を回復させる医療であると捉えることができる。また、液性因子などの生理活性物質を介して生体に存在する内因性の幹細胞を活性化する医療も、広義には再生医療に含まれる。

再生の要である幹細胞は、その由来や能力から分類がなされている。そのうちの一つである成体幹細胞は、体性幹細胞、組織幹細胞とも呼ばれ、各組織における機能細胞やそれらの前駆細胞の供給源として存在し、成体組織の再生と修復を司っている。1963年の **Becker** らによる造血幹細胞の発見にはじまり (**Becker et al., 1963**)、これまでに様々な組織から成体幹細胞が発見された。例えば、成体幹細胞の一つである間葉系幹細胞は、骨や軟骨、血管といった中胚葉由来の組織に分化が可能であると同時に、増殖因子の分泌、血管新生促進作用といった組織修復を促進する生物活性を有することが報告されている (**Uccelli et al., 2008**)。骨髄や臍帯組織、臍帯血などから比較的容易に入手が可能であることから、脊髄損傷などを適応として承認を受けている医療製品も存在する (**Jossen et al., 2018**)。一方で、体性幹細胞は通常、特定の複数種の細胞にしか分化することができず (多分化性)、特に分化細胞の供給源としての観点から、その汎用性には限定的な



面もある。

それに対し、分化条件によって三胚葉いずれの細胞種に分化可能な能力（多能性）を有する幹細胞は、多能性幹細胞と呼ばれる。その代表的なものが、胚性幹細胞（embryonic stem cell : ES 細胞）である。1981年に Martin Evans ら、Gail Martin らがマウス胚から多分化能をもつ多能性幹細胞の樹立、培養に成功し (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981、1998年には、James A. Thomson らによりヒト ES 細胞の樹立が世界で初めて報告された Thomson et al., 1998)。その後、ES 細胞樹立のための技術改良を経つつ、ハーバード大学の Douglas A. Melton のグループや、本邦でも京都大学の中辻、末森らのグループもヒト ES 細胞の樹立に成功した (Cowan et al., 2004; Suemori et al., 2006)。しかし、多能性を有するヒト ES 細胞の再生医療へ応用が期待される一方で、その樹立過程における受精卵の破壊が、倫理的な問題となっている。また、ヒト ES 細胞の医療応用は基本的に他家移植となり、ドナーとレシピエントの遺伝的バックグラウンドの相違、とりわけ、主要組織適合遺伝子複合体の相違による拒絶反応が生じる問題も懸念される。

これらの課題に対し、2006年、京都大学の高橋と山中は、マウスの体細胞に初期化4因子（4F）と呼ばれる転写因子（OCT4、SOX2、KLF4、c-MYC）を強制的に体細胞へ発現させることで形質転換を行い、遺伝情報を初期化することでES細胞とほぼ同等の自己複製能と多分化能を有する多能性幹細胞が作製可能であることを報告し、この新型多能性幹細胞を人工多能性幹細胞（iPS細胞）と命名した (Takahashi and Yamanaka, 2006)。2007年には、同様の方法でヒト iPS 細胞を樹立可能であることが報告された (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007)。ヒト iPS 細胞は、受精卵を用いることなく体細胞の初期化により作製が可能であるため、医療応用に際しての倫理的懸念が少ない。また、患者由来の細胞を用いて個別作製を行えば、自家移植治療が可能になり、免疫拒絶の問題も克服されることが考えられる。このブレークスルーから iPS 細胞に関する研究は目覚ましい発展を遂げ、これまでに、ヒト iPS 細胞から心筋細胞や神経細胞、肝臓細胞といった多様な細胞種が機能的な状態で分化誘導可能であることが多くの研究者により示され、その一

部は臨床応用研究の段階にある (Kondo et al., 2018; Okano and Yamanaka, 2014; Shi et al., 2017)。さらに、初代培養細胞としては入手が難しいヒト由来の機能的細胞を均一かつ大量に供給可能であることから、再生医療への直接応用に加え、創薬研究における新薬探索や副作用評価などにも幅広く用いられている。

このように、幹細胞研究の進展は目覚ましく、その自己修復力と再生能力の医療応用によるパラダイムシフトのみならず、分化誘導された組織をモデルとして基礎研究や創薬研究における活用など、幅広い応用が強く期待されている (図 1)。

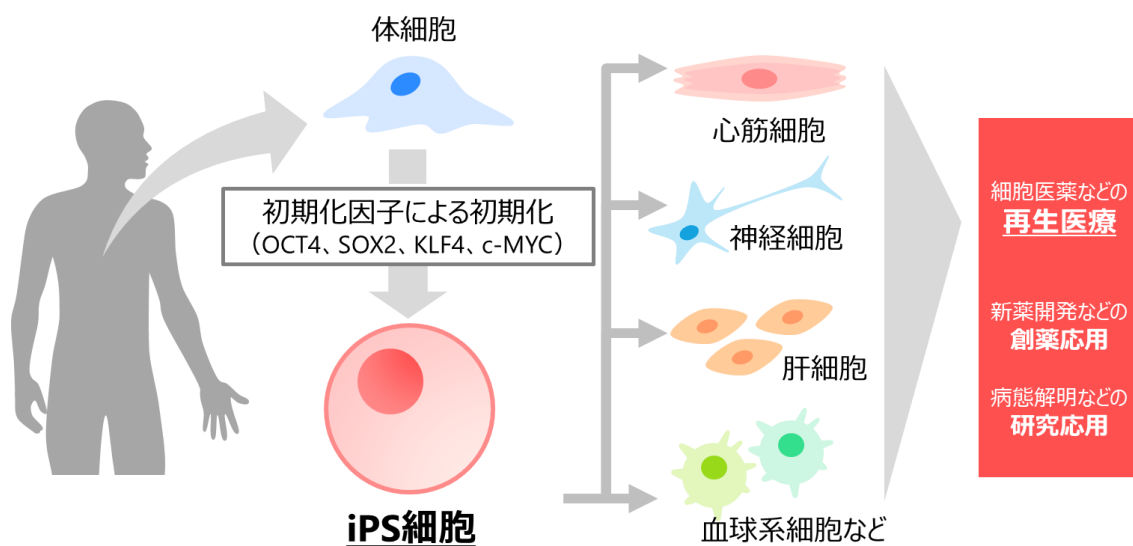


図 1. iPS 細胞とその応用

iPS 細胞の初期化過程と、分化誘導、臨床応用の可能性について示す。体細胞から初期化 4 因子 (OCT4、SOX2、KLF4、c-MYC) の導入によって得られる iPS 細胞は、種々の機能性細胞への分化誘導が可能であり、再生医療をはじめとする多くの分野での応用が期待される。

## 1.2. 多能性幹細胞と STAT3 シグナル

前述のように多能性幹細胞の医療応用が強く期待される一方で、その実現のための課題は決して少なくない。医薬品としての品質基準対応や、安定供給、そのためのロジスティクスなど産業面での課題はもちろんであるが、幹細胞の安定した作製、安全性やコスト増大のリスクとなり得るウイルスベクターや生体由来因子からの脱却、有効性に繋がる分化効率や細胞機能性の追求など、多能性幹細胞のもつ性質と挙動を精密に制御することが求められている。この課題解決のためには、ひとえに多能性幹細胞に関する生物学的理解が欠かせない。とりわけ、細胞制御の基盤であるシグナル伝達に関する理解が肝要であると考えられる。

多能性幹細胞の制御に関連するシグナル伝達経路は複数報告されているが、その中でも、多能性の誘導や維持、多能性幹細胞からの分化誘導といった細胞制御機構に広く関与し、重要なものの1つとして考えられているのが JAK と STAT3 によるシグナル伝達経路である。

JAK/STAT3 シグナルと多能性維持に関する研究は、今では多くの多能性幹細胞の維持培養プロトコルで採用されている leukemia inhibitory factor (LIF) に関する知見の発見と関連が深い。液性因子である LIF に、マウス ES 細胞の多能性を維持する機能があることが報告されたのは、1998 年のことであった (Smith et al., 1988)。LIF は interleukin (IL)-6 ファミリーに属するサイトカインであり、glycoprotein 130 (gp130) と LIF 受容体からなるヘテロ二量体を受容体として細胞内に複数のシグナルを伝達することが知られている。中でも、機能的に重要であると考えられているものの1つが JAK/STAT3 シグナル経路である。実際に、そのシグナル伝達阻害により LIF によるマウス ES 細胞の自己複製能が失われること (Niwa et al., 1998)、逆にシグナル伝達の活性化により、LIF の非存在下であっても自己複製能が維持されること (Matsuda et al., 1999) からも、多能性維持における重要な機能を有することが示唆されている。なお、LIF 下流において、幹細胞の多能性維持に関与するシグナル伝達経路は、JAK/STAT3 シグナル以外にも、

phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/AKT シグナルや mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナルなどが知られている。多能性の発揮に重要な KLF4 や SOX2、NANOG や OCT3/4 といった協調的に機能する一連の転写因子群の発現は、上記のシグナル伝達により制御されており、多能性幹細胞の機能維持に寄与していることが報告されている (Niwa et al., 2009、**図 2**)。

さらに、LIF を介した STAT3 シグナルの活性化は、多能性の維持のみならず、多能性の獲得においても重要な機能を有していることが知られている。例えば、リン酸化により二量体化し活性化した STAT3 は、OCT4 や NANOG といった初期化に重要な遺伝子のプロモーター領域に直接結合し、その発現を亢進させることが知られている (Chen et al., 2008; Niwa et al., 2009) ほか、恒常活性型の STAT3 の導入により、マウス胎仔由来の線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast : MEF) の初期化因子による初期化効率が上昇することが報告されている (Tang et al., 2012)。また、人為的に STAT3 活性を上昇させることで、着床後のマウス胚から誘導した prime 型と称される未分化度の低いエピブラスト幹 (epiblast stem : EpiS) 細胞を、着床前の胚盤胞より樹立された未分化度の高い、naïve 型とも表現される ES 細胞様の形質をもつ細胞へとリプログラミングさせることが可能であると報告されている (van Oosten et al., 2012; Yang et al., 2010)。さらに、STAT3 シグナルが、初期化過程におけるエピジェネティックな制御にも関与していることが報告されており、JAK/STAT3 シグナルの阻害により、DNA メチルトランスフェラーゼやヒストン脱アセチル化酵素の発現が上昇することで OCT4 や NANOG といった初期化因子の発現に重要な遺伝子領域の脱メチル化が阻害される結果、それらの発現が抑制され、初期化効率に影響することが報告されている (Tang et al., 2012)。近年では、LIF や JAK 下流における STAT3 シグナルだけではなく、IL-6 及びその受容体の下流において活性化される STAT3 シグナルが、ホメオボックス転写因子である NKX3-1 を介して初期化過程に関与していることも報告されている (Mai et al., 2018)。

以上のように、STAT3 によるシグナル伝達は、その下流で初期化因子をはじめとする

協調的な機能遺伝子発現を制御することで、多能性の獲得からその維持に至るまで重要な機能を有している。表 1 では、JAK/STAT3 シグナルを活性化するサイトカインが、多能性幹細胞の機能維持や体細胞初期化においても重要な役割を果たしていることを報告した例を一覧として示す。多能性幹細胞の医療応用にあたっては、こういった細胞の機能制御に関与する分子基盤を十分に理解した上で、それらを効率的かつ緻密に制御できる技術の開発が必要になる。

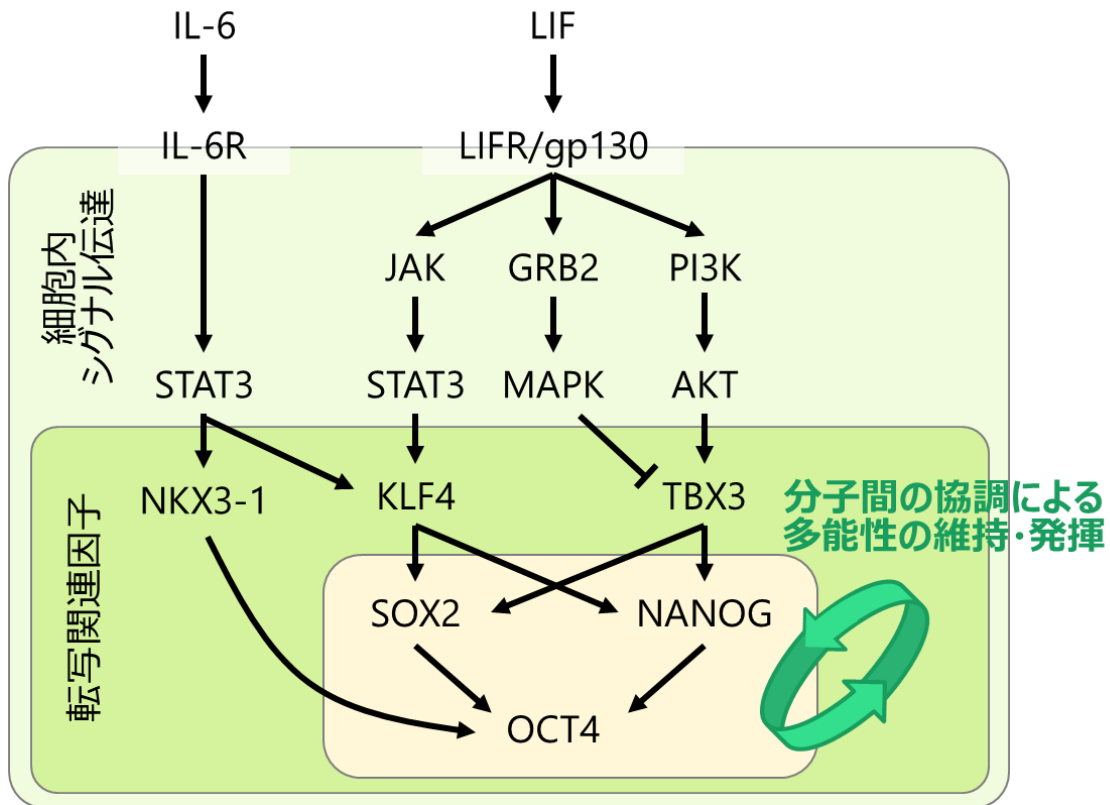


図 2. 多能性幹細胞の機能維持・発揮に重要な転写因子群とシグナル伝達

多能性幹細胞において、その機能の維持と発揮に重要な転写因子群およびシグナル伝達経路の関係性を示す。IL-6 や LIF といったサイトカイン下流において惹起される各シグナル伝達経路は、多能性の維持や発揮に重要な KLF4 や SOX2、NANOG や OCT3/4 といった、協調してはたらく一連の転写因子群の発現制御に寄与している。

表 1. STAT3 と多能性幹細胞の制御に関する報告一覧

リガンド	受容体	対象細胞・組織	関与する機能とメカニズム	参考文献
LIF	LIFR/gp130	早期胚	早期発生：臓側内胚葉に関連	Takeda et al., 1997.
LIF	LIFR/gp130	マウス ES 細胞	多能性の維持：SOX2 活性化による KL4 発現誘導	Bourillot et al., 2009; Matsuda et al., 1999; Niwa et al., 2009
LIF	LIFR/gp130	ヒト ES 細胞	多能性の獲得 (naïve 型)	Chen et al., 2015
G-CSF	GCSFR/gp130 Y118F chimeric receptor	マウス Epis 細胞	多能性の獲得 (naïve 型)	van Oosten et al., 2012; Yang et al., 2010.
LIF	LIFR/gp130	マウス線維芽細胞	体細胞からの初期化 (マウス)	Tang et al., 2012.
IL-6	IL6R	マウス及びヒト線維芽細胞	体細胞からの初期化 (マウス)	Mai et al., 2018



### 1.3. 多能性幹細胞からの心筋分化誘導と G-CSF

ここでは、多能性幹細胞の医療応用が期待される疾患領域について論じる。候補となる疾患領域は複数挙げられるが、その一つが心疾患領域である。心疾患は、悪性新生物に次いで、国内における死亡要因第2位であり、2018年には20万人以上が心疾患により命を落としている。中でも、心筋細胞の喪失や変性を原因とする心不全によるものが最大であり、その数はこの20年間で約2倍に急増している。国内における心不全患者数は100万人以上といわれており、そのうち10万人以上が難治性重症心不全患者であるといわれている (Okura et al., 2008)。難治性重症心不全の治療としては心臓移植が挙げられるが、ドナー不足により年間50例程度の実施であり、有効な治療法が確立されているとは言い難い。その課題解決のため、幹細胞を用いた心筋再生研究と医療応用が精力的に進められている。

欠損した心筋組織に体外で誘導した十分な量の心筋細胞を患者に移植するためには、多能性幹細胞からの効率的な心筋細胞の分化誘導法が必要である。心筋分化誘導に必須とされる心発生の分子メカニズムを背景に、これまでに多数の分化誘導法が開発され、報告がなされている (Burridge et al., 2014)。中胚葉の発生から心筋芽細胞の派生、増殖、心筋細胞への成熟を伴う分化の過程は、時空間的に厳密な制御がなされており、この制御には各種のサイトカイン、成長因子、microRNA など、多様な因子が関与しており、多能性幹細胞からの心筋分化手法にもこれらの知見が活用されている (Srivastava, 2006)。

上記の因子のうち、顆粒球コロニー形成刺激因子 G-CSF は、受容体を介して主に JAK/STAT3 シグナル経路の活性化することが知られており、骨髄系前駆細胞の増殖、分化、生存の促進作用や、骨髄幹細胞、成熟好中球の遊走、抗アポトーシス作用、抗炎症作用などを有することが報告されている (Chen et al., 2006; Demetri and Griffin, 1991; Panopoulos et al., 2012; Welte et al., 1996)。一方で、マウス胎生期において、G-CSF とその受容体 (G-CSF receptor : GCSFR) が発生過程の心臓部位で顕著に発現亢進し、臓器

形成時の心筋細胞増殖に重要な役割を担っていることが報告された (Shimoji et al., 2010)。この研究では、GCSFR の欠損により iPS 細胞ないし ES 細胞由来の心筋細胞増殖が阻害されること、iPS 細胞由来心筋細胞へ G-CSF を刺激することにより、心筋細胞の細胞数が増加することが報告されている。以上のような G-CSF シグナルが有する心筋分化制御機構を応用することで、臨床応用のための効率的な心筋細胞作製法に繋がることが期待されている (図 3)。さらに、G-CSF 刺激やサイトカインなどによる JAK/STAT シグナルの活性化が心筋細胞に保護的な作用を及ぼす影響も多数報告されており (表 2)、心筋再生を促進する因子としても注目されている。

G-CSF の他にも、WNT や NOGGIN といった分泌因子が、多能性幹細胞からの心筋誘導に有効であることが報告されているが (Onizuka et al., 2012; Yuasa et al., 2005)、前述のように、細胞加工製品による医療・産業レベルでの応用を想定した際には、組換えタンパク質の直接の利用は、調製原価が増大することになり、コスト面での課題に繋がる。また、細胞調製のためにこれらの組換えタンパク質を用いる際には、使用材料として、それ自体にも医療応用を想定したクオリティコントロールが求められる可能性もある。医療経済性は再生医療全体の課題でもあり、原価コントロールのみで解決される課題ではないものの、低コストで特定の細胞を高効率に供給可能な体制は、再生医療にとって必要不可欠な基盤であるといえる。

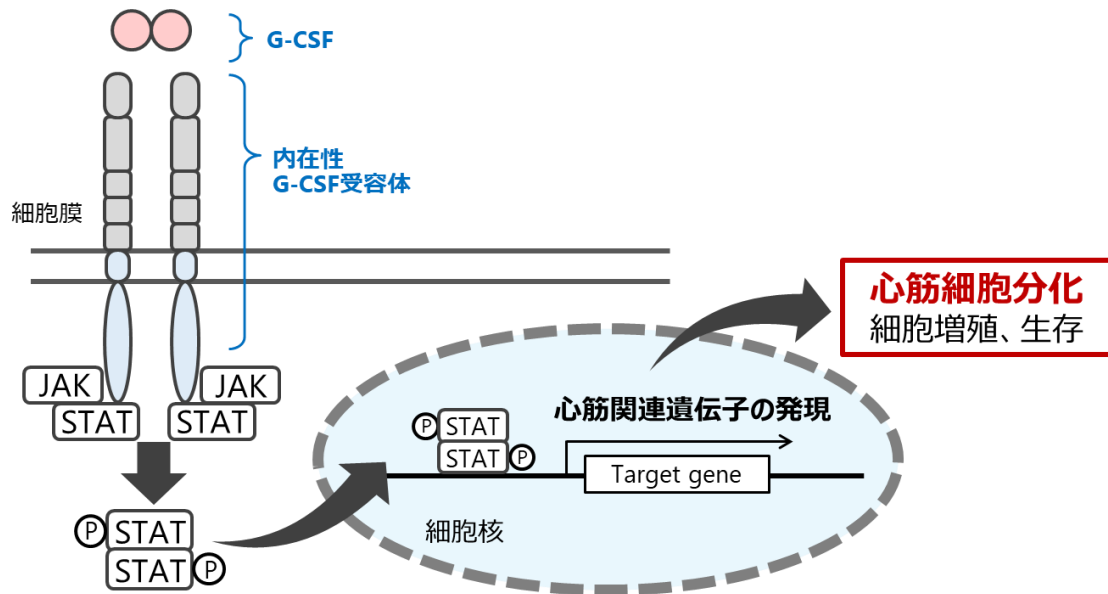


図 3. G-CSF とその受容体を介した STAT3 シグナルと心筋分化誘導

G-CSF と G-CSF 受容体による JAK/STAT3 シグナル惹起とその下流における遺伝子発現誘導の模式図を示す。G-CSF 受容体は、リガンドである G-CSF が細胞外領域に結合することで二量体化し、細胞内の JAK/STAT3 シグナルを惹起する。リン酸化により二量体化した STAT3 は核内へ移行し、特定の遺伝子発現を誘導することで、心筋分化誘導を促進する。

表 2. STAT3 シグナルが心筋細胞へ及ぼす影響に関する報告一覧

リガンド	受容体	対象細胞・組織	関与する機能とメカニズム	参考文献
G-CSF	GCSFR	胚性心臓	心臓発生：心筋細胞の増殖	Shimoji et al., 2010
G-CSF	GCSFR	骨髄幹細胞	心筋梗塞に対する心保護作用：心筋細胞の遊走	Adachi et al., 2004; Jackson et al., 2001; Kawada et al., 2004; Kocher et al., 2001; Minatoguchi et al., 2004; Orlic et al., 2001a; Orlic et al., 2001b
G-CSF	GCSFR	骨髄幹細胞	心筋梗塞に対する心保護作用：心筋細胞の生存促進	Balsam et al., 2004; Murry et al., 2004; Norol et al., 2003
-	miR-124	骨髄幹細胞	病態関連因子：心筋分化の抑制	Cai et al., 2012
G-CSF	GCSFR	心筋細胞	心筋梗塞に対する心保護作用：抗アポトーシス作用、心室リモデリングの抑制	Enomoto et al., 2015; Harada et al., 2005; Negoro et al., 2000
G-CSF	GCSFR	血管内皮細胞	心筋梗塞に対する心保護作用：細胞生存、血管新生	Enomoto et al., 2015; Harada et al., 2005; Negoro et al., 2000
-	miR-199-5p	心筋細胞	病態関連因子：タンパク質代謝異常	Haghikia et al., 2011
-	miR-199-5p	血管内皮細胞	病態関連因子：酸化ストレス上昇	Haghikia et al., 2011
-	-	マウス成体心臓	虚血再灌流傷害に対する心保護作用：酸化ストレス、ミトコンドリア障害及びアポトーシスの低減、血管新生促進	Hilfiker-Kleiner et al., 2004; O'Sullivan et al., 2016; Oshima et al., 2005
-	-	マウス成体心臓	虚血再灌流傷害に対する心保護作用：抗酸化物質 metallothioneins の上昇、活性酸素種の発生活低減	Boengler et al., 2013; Negoro et al., 2001; Oshima et al., 2005
-	-	マウス成体心臓	ドキシソルビシン関連心筋症に対する心保護作用：抗酸化物質 metallothionein 1 及び 2 の上昇を介した細胞生存	Rong et al., 2016
NA	gp130	マウス成体心臓	ドキシソルビシン関連心筋症に対する心保護作用：S-propargyl-cysteine 応答に関与	Wu et al., 2016
IL-6	-	心臓線維芽細胞	線維形成：コラーゲン合成	Datta et al., 2017; Melendez et al., 2010
Angiotensin II /Rac1	-	心臓線維芽細胞	線維形成：コラーゲン合成	Tsai et al., 2008
LIF	LIFR/gp130	心筋細胞	細胞肥大：サイトカインを介した細胞肥大と抗アポトーシス	Yasukawa et al., 2001

表 2. 続き

リガンド	受容体	対象細胞・組織	関与する機能とメカニズム	参考文献
Angiotensin II	—	H9c2 細胞株	抗細胞肥大：AMPK $\alpha$ 及び mTOR の活性化を介したオートファジー関連因子の抑制	Chen et al., 2017.
Angiotensin II	—	H9c2 細胞株	抗細胞肥大：AMPK $\alpha$ 及び mTOR の活性化を介したオートファジー関連因子の抑制	Chen et al., 2017.
—	—	マウス成体心臓	高血圧に対する心保護作用：脂肪酸酸化から解糖系へのエネルギー代謝経路の切り替え阻害	Altara et al., 2016
—	gp130	マウス成体心臓	高血圧に伴う肥大型心筋症に対する心保護作用：抗アポトーシス	Hirota et al., 1999; Uozumi et al., 2001; Yamauchi-Takahara and Kishimoto, 2000.
Il11a	—	ゼブラフィッシュ心臓	傷害後心筋再生：心内膜及び炎症系細胞からのサイトカイン産生による心筋細胞増殖促進	Fang et al., 2013; Jopling et al., 2010;
IL-11	—	心臓線維芽細胞	心筋梗塞に対する心保護作用：アポトーシス、線維化、心室リモデリング及び血管新生の抑制	Liang et al., 2012; Zhao et al., 2014 Obana et al., 2010
IL-13	—	新生仔マウス心臓	傷害後心筋再生：発達、成熟期における転写プロファイルへの回帰	O'Meara et al., 2015

#### 1.4. 人工キメラ受容体と細胞制御

多能性幹細胞からの分化誘導に關与するシグナル伝達経路を、安価に実現するための施策として、各種刺激因子の低分子化合物での置換が検討され、報告されている (Kempf and Zweigerdt, 2018)。各種化合物が分化用培地の成分として応用されており、大幅なコストカットが期待される一方で、本来、リガンド分子と受容体間のタンパク質間相互作用によって入力されるシグナル伝達を、主活性面だけでなく特異性面での担保も含めて相互作用点の少ない低分子で忠実に再現することは技術的難度が高く、必ずしも低分子による代替が可能な因子ばかりではない。また、最適な化合物の探索のためには、膨大な化合物のスクリーニングと高度な化学合成が必要となるため、探索・検討のハードルが存在することも確かである。そのため、コスト削減に加えて、システムチックに生体由来のリガンドや刺激因子のもつ特異性を再現できるアプローチが求められている。

これら課題解決の一助として興味深いのが、人工キメラ受容体の応用である。人工キメラ受容体とは、受容体タンパク質中のリガンドと結合部位を、リガンドとは異なる分子を認識・結合するドメイン構造に置換した人工受容体である。代替ドメインとしては抗体の可変領域部分が頻用されている。この人工キメラ受容体は、置換した抗体に共役する抗原分子をリガンドとして認識し、抗原抗体反応を利用することで受容体由来のシグナルを伝達することができる。この手法であれば、生理活性をもたない分子と、それに対する特異的抗体を取得することで比較的簡便に構築が可能であると同時に、制御対象である細胞の特異的制御、例えば、抗原分子依存的に細胞の増殖シグナルを伝達させることで、人工キメラ受容体を導入した細胞のみを人為的に増殖制御するといった応用が可能である。実際に、一本鎖化された抗体の可変領域 (single-chain variable fragment : scFv) を gp130、IL2 受容体、EGF 受容体の細胞外領域に置換した人工キメラ受容体を用いることで、それぞれの下流シグナル伝達経路の活性化が可能であることが報告されている (Kawahara et al., 2011; Kawahara et al., 2004; Kawahara et al., 2003; Liu et al., 2009; Sogo et al., 2008; Sogo et al., 2009; Tanaka et al., 2009)。近年では、キメラ抗原受容体

(chimeric antigen receptor : CAR) と呼ばれる、特定のがん抗原を認識する人工キメラ受容体を導入した T 細胞を用いることで、免疫賦活による抗がん作用を示す細胞療法 (CAR-T 療法) の臨床応用も開始され、注目されている (Feigal et al., 2019)。

これまでに人工キメラ受容体を細胞の分化に応用した例は見受けられないが、上述した前例を鑑みるに、多能性幹細胞から心筋分化に有用なシグナル伝達を、その特異性を保ちつつ再現することは可能であると予想される。また、リガンドとして、安定供給が可能で安価な分子を用いることにより、再生医療におけるコスト面での課題解決に繋がると期待できることから、注目すべき細胞工学技術であるといえる。

## 1.5. 本研究の意義と目的

これまで述べてきたように、ES 細胞や iPS 細胞といった多能性幹細胞の樹立とともに再生医学が注目され、再生医療の展開がますます望まれている。しかし、臨床応用にむけた課題が少なくないのも現状である。中でも、治療に必要なだけの細胞を効率よく大量に、しかも経済的に製造することは、再生医療の成功のために必要不可欠な要素と考えられる。

そこで本研究では、上記の課題解決の一助とすべく、心筋再生医療への応用を念頭に、多能性幹細胞から効率的かつ、経済的に心筋細胞を誘導可能な細胞工学技術の開発に取り組んだ。過去の研究において、人工キメラ受容体を用いることで特異的なシグナル伝達と細胞活性の誘導に成功した報告が複数なされているが、心筋細胞の産生に重要と考えられる G-CSF 受容体を介した STAT シグナル経路の活性化については、適用の報告がない。そこで、本研究では、実際に代替リガンドに応答する人工 G-CSF キメラ受容体を設計・作製し、iPS 細胞に導入することで、その有用性を検討した。その際、リガンドとなる抗原分子としては、過去の研究に倣い、蛍光色素分子 Fluorescein (FL) を BSA にコンジュゲートさせた BSA-FL を用いた。この FL 分子は、単独では免疫応答を誘導する能力のないハプテン抗原であり、生理活性も持たない小分子であるため、生体への応用も可能であるという利点をもつ。本論文では、この G-CSF に対する人工受容体の検討結果とともに、多能性幹細胞の医療応用と人工キメラ受容体のもつ可能性について論じる。

これらの研究成果は、多能性幹細胞の医療応用における課題の一つである、分化細胞の効率的、かつ経済的な供給に寄与するものとして、再生医療分野の発展に貢献し得る、極めて意義の深いものと考えられる。



## 第2章 実験方法と材料

### 2.1. プラスミド構築

野生型のマウス GCSFR と、それを基に本研究で構築した、アミノ酸鎖長の異なる 2 種類の人工 G-CSF キメラ受容体、GCSFRS (chimeric GCSFR with short extracellular domain) 及び GCSFRL (chimeric GCSFR with long extracellular domain) のアミノ酸配列を図 4~6 に示す。これらを細胞に発現させるためのプラスミドを以下のように構築した。

人工 G-CSF キメラ受容体遺伝子の構成要素である、FL 分子に対する scFv (抗 FL-scFV) に相当する遺伝子断片は、Ian M. Tomlinson 博士から贈与いただいた clone 31IJ3 由来のものをを用いた (de Wildt et al., 2000)。人工 G-CSF キメラ受容体遺伝子のうち、内在性 GCSFR に相当する遺伝子断片は、BL6 系統マウス心臓由来の全 RNA 又は BL6 系統マウスの胚由来の全 RNA を鋳型として、逆転写を実施後に、PCR 操作により取得した。制限酵素である BspEI サイトを PCR 産物の両端に付加し、pCR2.1 ベクター (Thermo Fisher Scientific, USA) へ TA クローニングにより導入することで、pCR2.1-mGCSFRS 及び pCR2.1-mGCSFRL を作製した。CAG (cytomegalovirus early enhancer/chicken  $\beta$  actin) プロモーター下流に抗 FL-scFV に相当する遺伝子断片を、IRES (internal ribosome entry site) 下流にネオマイシン耐性遺伝子を含むレンチウイルスベクター pLenti-CAG-scFv-IRES-Neo を作製した後、BspEI により切断した pCR2.1-mGCSFRS 及び pCR2.1-mGCSFRL 由来の断片をそれぞれ挿入することで、scFv を細胞外ドメインに有し、キメラ G-CSF 受容体とネオマイシン耐性遺伝子を共発現する pLenti-CAG-scGCSFRS-IRES-Neo、及び pLenti-CAG-scGCSFRL-IRES-Neo を作製した。mock ベクターとしては、ネオマイシン耐性遺伝子のみを発現する pLenti-CAG-IRES-Neo を使用した。

MVGLGACTLTGVTLIFLLLPRSLLESCGHIEISPPVVRLGDPVLASCTISPNC SKLD  
QQAKILWRLQDEPIQPGDRQHHL PDGTQESLITLPHLNYTQAFLFCLVPWEDSV  
QLLDQAELHAGYPPASPSNLSCLMHLTTNSLVCQWEPGPETHLPTSFILKSFRSR  
ADCQYQGD TIPDCVAKKRQNNCSIPRKNLLYQYMAIWVQAENMLGSSESPKL  
CLDPM DVVKLEPPMLQALDIGPDVVSHQPGCLWLSWKPWKPSEYMEQECEL R  
YQPQLKGANWTLVFHLPSSKDQFELCGLHQAPVYTLQMRCIRSSLPGFWSPWS  
PGLQLRPTMKAPTIRLDTWCQKKQLDPGTVSVQLFWKPTPLQEDSGQIQGYLL  
SWSSPDHQGQDIHLCNTTQLSCIFLLPSEAQNVTLVAYNKAGTSSPTTVVFLENE  
GPAVTGLHAMAQDLNTIWVDWEAPSLLPQGYLIEWEMSSPSYNN SYKSWMIEP  
NGNITGILLKDNINPFQLYRITVAPLYPGIVGPPVNVYTFAGERAPPHAPALHLKH  
VGT TWAQLEWVPEAPRLGMIPLTHY TIFWADAGDHSFSVTLNISLHDFVLKHLE  
PASLYHVYLMATSRAGSTNSTGLTLRTLDP SDLNIFLGILCLVLLSTTCVVTWLC  
CKRRGKTSFWSDVPDPAHSSLSSWLPTIMTEETFQLPSFWDSSVPSITKITELEED  
KKPTHWDSESSGNGSLPALVQAYVLQGDPREISNQSQPPSRTGDQVLYGQVLES  
PTSPGVMQYIRSDSTQPLLGGPTSPKSYENIWFHSRPQETFVPQPPNQEDDCVF  
GPPFDFPLFQGLQVHGVVEEQGGF

#### 図 4. 野生型マウス GCSFR のアミノ酸配列

紫字で GCSFR のシグナル配列を含む細胞外ドメインのアミノ酸配列を、赤字で膜貫通ドメインと細胞内ドメインのアミノ酸配列を示す。

MGWSCIIILFLVATATGVHSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS  
WVRQAPGKGP EWVSGIAGAGMRTWYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR  
AEDTAVYYCAKYRRGFDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSTDIQMTQS  
PSSLSASV GDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYTASTLQSGVPSRFS  
GSGSGTDFLT ISSLQPEDFATYYCQQAHSPPFTFGQGTKVEIKGSGLNIFLGILCL  
VLLSTTCVVTWLCCKRRGKTSFWS DVPDPAHSSLSSWLPTIMTEETFQLPSFWD  
SSVPSITKITELEEDKKPTHWDSESSGNGSLPALVQAYVLQGDPREISNQSQPPSR  
TGDQVLYGQVLESPTSPGVMQYIRSDSTQPLLGGPTSPKSYENIWFHSRPQETF  
VPQPPNQEDDCVFGPPFDPLFQGLQVHGVEEQGGF

**図 5. 人工キメラ受容体 GCSFRS のアミノ酸配列**

緑字で免疫グロブリン重鎖由来のシグナル配列を、青字で抗 FL 抗体由来の scFv アミノ酸配列を、黒字でリンカー配列を、赤字でマウス GCSFR 由来の膜貫通ドメインと細胞内ドメインのアミノ酸配列を示す。

MGWSCILFLVATATGVHSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS  
WVRQAPGKGPEWVSGIAGAGMRTWYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR  
AEDTAVYYCAKYRRGFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSTDIQMTQS  
PSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGAPKLLIYTASTLQSGVPSRFS  
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAHSPPFTFGQGTKVEIKGSGVKLEPPML  
QALDIGPDVVSHQPGCLWLSWKPWKPSEYMEQECELRYQPQLKGANWTLVFN  
LPSSKDQFELCGLHQAPVYTLQMRCIRSSLPGFWSPWSPGLQLRPTMKAPTIRL  
DTWCQKKQLDPGTVSVQLFWKPTPLQEDSGQIQGYLLSWSSPDHQGDHLCN  
TTQLSCIFLLPSEAQNVTLVAYNKAGTSSPTTVVFLNEGPAVTGLHAMAQDLNT  
IWVDWEAPSLLPQGYLIEWEMSSPSYNN SYKSWMIEPNGNITGILLKDNINPFQL  
YRITVAPLYPGIVGPPVNVYTFAGERAPPHPALHLKHVGT TWAQLEWVPEAPR  
LGMIP LTHYTIFWADAGDHSFSVTLNISLHDFVLKHLEPASLYHVYLMATSRAGS  
TNSTGLTLRTLDPSDLNIFLGILCLVLLSTTCVVTWLCCKRRGKTSFWS DVPDPA  
HSSLSSWLPTIMTEETFQLPSFWDSSVPSITKITELEEDKKPTHWDSESSGNGSLP  
ALVQAYVLQGDPREISNQSQPPSRTGDQVLYGQVLESPTSPGVMQYIRSDSTQPL  
LGGPTSPKSYENIWFHSRPQETFVPQPPNQEDDCVFGPPDFDFPLFQGLQVHGVE  
EQGGF

#### 図 6. 人工キメラ受容体 GCSFRL のアミノ酸配列

緑字で免疫グロブリン重鎖由来のシグナル配列を、青字で抗 FL 抗体由来の scFv アミノ酸配列を、黒字でリンカー配列を、紫字でマウス GCSFR 由来の細胞外ドメインのアミノ酸配列を、赤字でマウス GCSFR 由来の膜貫通ドメインと細胞内ドメインのアミノ酸配列を示す。

## 2.2. 細胞培養

マウス iPS 細胞は、終濃度 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の Mitomycin C (Sigma Aldrich) にて 2 時間処理を行った MEF をフィーダー細胞として共培養し、培養液中には LIF (富士フィルム和光純薬) を終濃度が 1000 U/mL になるように添加し培養を行った。各々の培養に用いた培地組成について表 3 に示す。すべての細胞培養は、37  $^{\circ}\text{C}$ 、20%酸素、5%二酸化炭素の条件下で、湿度を十分に保ちながら、専用の細胞培養器 (Thermo Fisher Scientific) 内で行った。

また、マウス iPS 細胞への人工 G-CSF キメラ受容体の導入は、レンチウイルスベクターを用いて実施した。前項で作製したレンチウイルスベクター作製用プラスミドを HEK293T 細胞に Lipofectamine2000 Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いてトランスフェクションした翌日に、0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターを用いて濾過した培養上清に、ポリブレン液を添加したものをウイルス溶液として iPS 細胞に感染させることで実施した。ウイルスベクター感染後は終濃度 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の G418 硫酸塩 (Thermo Fisher Scientific) で細胞選択を行い、得られた細胞を安定発現株として用いた。

表 3. MEF 及びマウス iPS 細胞培養で用いた培地組成

MEF 培養培地	
	終濃度
Dulbecco's Modified Eagle Medium (ナカライテスク)	
Fetal Bovine Serum (ニチレイバイオサイエンス)	10%
GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific)	1%
Penicillin- Streptomycin Solution (富士フィルム和光純薬)	100%
マウス iPS 細胞培養培地	
	終濃度
Dulbecco's Modified Eagle Medium (ナカライテスク)	
KnockOut Serum Replacement (Thermo Fisher Scientific)	15%
GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific)	1%
Penicillin- Streptomycin Solution (富士フィルム和光純薬)	1%
100 mmol/l Sodium Pyruvate Solution (富士フィルム和光純薬)	1%
MEM NEAA (Thermo Fisher Scientific)	1%
EmbryoMax <sup>®</sup> Nucleosides (Merck Millipore)	1%
2-Mercaptoethanol 55 mM in D-PBS (Thermo Fisher Scientific)	0.2%

### 2.3. iPS 細胞からの分化誘導とカルシウムイメージング解析

マウス iPS 細胞からの分化誘導は、胚様体 (embryoid body : EB) 形成により行った (Kawamura et al., 2009)。未分化状態で培養したマウス iPS 細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (D-phosphate buffered saline(-) : D-PBS(-) ) で洗浄し、トリプシンで 37 °C、3 分間の処理をした後、細胞を剥離した。次に、1 well あたり 6000 細胞/100  $\mu$ L で 96-well plate ultra surface (Corning) に播種し、EB 形成を促すために浮遊条件下で培養を開始した。細胞の播種後 2 日毎に新たな培地を 100  $\mu$ L/well ずつ添加し、浮遊培養開始 6 日後に EB を回収し、ゼラチンでコーティングした 48-well plate に再播種させ接着培養に移行した。培養中は顕微鏡により経過観察を行い、細胞塊の自己拍動が観察されたものについて、以下のようにカルシウムイメージングによる解析を施行した。

カルシウムイメージングは以下の手法により実施した。接着培養中の細胞の培地を吸引、除去し、蛍光カルシウム指示薬である Fluo-8 AM (AAT Bioquest) 溶液を添加した。37 °C で 30 分間インキュベートし Fluo-8 を取り込ませた後、細胞培養系中の蛍光を BZ-X710 (KEYENCE) で観察し、その強度を測定した。

## 2.4. Western blotting

細胞内シグナル伝達の解析は、Western blotting 法により実施した。通常の培養培地を除去した後、リガンドによる刺激のため、BSA-FL あるいは LIF を添加した培地を添加し、目的の時間培養を継続した。リガンド刺激の後、2× sodium dodecyl sulfate (SDS) lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS) を用いて細胞溶解液を調製した。細胞溶解液中に含まれるゲノム DNA をソニケーションにより寸断した後、BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific) を用いて溶液中のタンパク質濃度を定量した。SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) のためグリセロール(富士フィルム和光純薬)、bromophenol blue (富士フィルム和光純薬)、2-mercaptoethanol (富士フィルム和光純薬) を含む溶液と細胞溶解液を混合し、95 °C 5 分間の熱処理による変性処理を行った。SDS-PAGE には 10%ポリアクリルアミドゲルを用い、1 枚あたり 15 mA で約 100 分間の電気泳動により展開した後、これを 90 V の条件下で 60 分間、ニトロセルロースメンブレン (GE Healthcare) に転写した。このメンブレンに、一次抗体として全 STAT3 あるいはリン酸化 STAT3 に対するウサギポリクローナル抗体 (Cell Signaling Technology、1:1000 希釈) を、二次抗体として Horse radish peroxidase をコンジュゲートさせた抗ウサギ IgG (Jackson ImmunoResearch) 抗体を反応させた後、Pierce Western Blotting substrate (Thermo Scientific) による化学発光反応を利用して目的のタンパク質を検出した。シグナル強度は ImageJ ソフトウェアを用いて定量化した。



## 2.5. 免疫染色

D-PBS(-)を用いて分化培養を行った iPS 細胞を洗浄した後、室温下、10%ホルマリンを含む D-PBS(-)溶液に 15 分間浸漬することで細胞の固定を行った。D-PBS(-)で 2 回洗浄して残存するホルマリンを除去した後、室温下、0.5% TritonX-100 を含む D-PBS(-)溶液で 15 分間、細胞膜に対する透過処理を行った。その後、3%の正常ヤギ血清（富士フィルム和光純薬）を含む D-PBS(-)溶液で室温下、45 分間のブロッキング処理を行った。次に、0.5% BSA/D-PBS(-)溶液に、一次抗体である  $\alpha$ -actinin（Calbiochem）を 1:5000 希釈で添加したものを 4 °C で一晩反応させた。洗浄後、二次抗体 anti-rabbit IgG-Alexa594 を 0.5% BSA/D-PBS(-)へ 1:500 で希釈させた溶液に添加し室温にて 1 時間反応させ、洗浄を経て、4', 6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (D-PBS(-)にて 1:3000 に希釈)を加え、室温にて 3 分間反応させることで細胞核の可視化を行った。最後に、細胞の蛍光を BZ-X710 を用いて観察し撮像を行った。

## 2.6. 定量 RT-PCR

分化誘導後の細胞由来の全 RNA を TriPure Isolation Reagent (SIGMA) を用いて回収した。回収した全 RNA のうち 10~500 ng を鋳型として Prime Script RT Master Mix (Takara Bio Inc.) を用いて逆転写反応を行った。次に 1~5 ng の逆転写物に対し、10  $\mu$ M のプライマー溶液を 0.6  $\mu$ l、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus, Takara Bio Inc.) を 7.5  $\mu$ l を加えて、蒸留水にて全量 15  $\mu$ l とした後、StepOnePlus リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム PCR を行い、遺伝子発現量の解析を実施した用いたプライマーペアを表 4 に示す。

統計解析は Student's t-test を用いて行った。統計解析を施したデータは標準偏差 (S.D.) を伴う平均値で表され、 $p < 0.05$  であった際に統計的に有意な差があると判定した。

表 4. 定量 RT-PCR に用いたプライマーペアの一覧

マーカー タイプ	遺伝子名	プライマー配列 (5' 端から 3' 端へ)
心筋細胞 マーカー	<i>α-MHC</i> ( <i>alpha-myosin heavy chain</i> )	F: 5' GAGATTTCTCCAACCCAG 3' R: 5' TCTGACTTTCGGAGGTACT 3'
	<i>β-MHC</i> ( <i>beta-myosin heavy chain</i> )	F: 5' CTACAGGCCTGGGCTTACCT 3' R: 5' TCTCCTTCTCAGACTTCCGC 3'
	<i>cardiac α-actin</i>	F: 5' CCAGCCCAGCTGAATCC 3' R: 5' CCATTGTCACACACCAAAGC 3'
	<i>Gata4</i>	F: 5' GCCTGTATGTAATGCCTGCG 3' R: 5' CCGAGCAGGAATTTGAAGAGG 3'
	<i>Nkx2.5</i>	F: 5' CTATGCCCTGTCCCTCAGA 3' R: 5' TCCCGGTCCTAGTGTGGA 3'
	<i>Tbx5</i>	F: 5' CCTACCTCCGTCATGTGAGA 3' R: 5' GACTGAGCCCGACATCCTA 3'
非心筋性 中胚葉 マーカー	<i>α-SMA</i> ( <i>alpha-smooth muscle actin</i> )	F: 5' CTGACAGAGGCACCACTGAA 3' R: 5' AGAGGCATAGAGGGACAGCA 3'
	<i>Gata1</i>	F: 5' AGCATCAGCACTGGCCTACT 3' R: 5' AGGCCAGCTAGCATAAGGT 3'
	<i>Gata3</i>	F: 5' CTCGGCCATTCGTACATGGAA 3' R: 5' GGATACCTCTGCACCGTAGC 3'
	<i>Osx</i>	F: 5' ATGGCGTCCTCTCTGCTTG 3' R: 5' TGAAAGGTCAGCGTATGGCTT 3'
	<i>Runx2</i>	F: 5' CGGCCCTCCCTGAACTCT 3' R: 5' TGCCTGCCGGGATCTGTA 3'
	<i>VE-Cad (vascular endothelial-cadherin)</i>	F: 5' AGACACCCCAACATGCTAC 3' R: 5' GCAAACCTCTCCTTGGAGCAC 3'

表 4. 続き

マーカー タイプ	遺伝子名	プライマー配列 (5' 端から 3' 端へ)
内胚葉 マーカー	<i>Afp</i>	F: 5' TCCAGAAGGAAGAGTGGACAA 3' R: 5' GCAGACTAGGAGAAGAGAAATAGTTGA 3'
	<i>Pdx1</i>	F: 5' CCCCAGTTTACAAGCTCGCT 3' R: 5' CTCGGTTCCATTCGGGAAAGG 3'
外胚葉 マーカー	<i>Nestin</i>	F: 5' CCCTGAAGTCGAGGAGCTG 3' R: 5' CTGCTGCACCTCTAAGCGA 3'
	<i>NeuroD1</i>	F: 5' ATGACCAAATCATACAGCGAGAG 3' R: 5' TCTGCCTCGTGTTCCCTCGT 3'
	<i>Pax6</i>	F: 5' AAGGAGGGGGAGAGAACACC 3' R: 5' TCTGAGCTTCATCCGAGTCTT 3'
ハウスキー ピング遺伝 子	<i><math>\beta</math>-actin</i>	F: 5' CTCTGGCTCCTAGCACCATGAAGA 3' R: 5' GTAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG 3'

## 第3章 結果

### 3.1. 人工 G-CSF キメラ受容体の設計と構築

G-CSF によるシグナル伝達を人工キメラ受容体により再現すべく、抗体の抗原結合部位と G-CSF 受容体のキメラ体を設計した。その模式図を図 7 に示す。代替リガンドとして蛍光色素分子 FL に応答させる目的で、人工キメラ受容体のリガンド結合部には、抗 FL 抗体の抗原結合部位にあたる可変部領域を採用した。具体的には、抗 FL 抗体可変部の H 鎖由来の領域と L 鎖由来の領域をリンカーにより一本鎖の状態にした scFv をリガンド認識部位とした。内在性の G-CSF 受容体は、イムノグロブリン (immunoglobulin : Ig) 様ドメイン、サイトカイン受容体相同 (cytokine receptor homologous : CRH) ドメイン、及びフィブロネクチン III 型 (fibronectin type III : FNIII) ドメインの 3 回繰り返し構造からなる細胞外領域と、膜貫通領域、細胞内領域からなる (Fukunaga et al., 1991、図 7A)。Ig 様ドメインと CRH ドメインへの G-CSF の結合が受容体の二量体化を引き起こし、細胞内での JAK/STAT シグナル伝達を惹起するものを考えられている (Tamada et al., 2006)。そこで、本研究では、GCSFRS、GCSFRL と呼称する長さの異なる 2 種類の人工 G-CSF キメラ受容体を設計し、前者は、内在性のマウス G-CSF 受容体の細胞外領域の大部分を欠損させ、抗 FL-scFv を内在性 G-CSF の膜貫通領域と細胞内領域に結合させた (図 7B)。一方、GCSFRL では、Ig 様ドメインのみを欠損させ、CRH ドメイン及び FNIII ドメインを残存させた形で抗 FL-scFv を結合させた (図 7C)。いずれも、細胞内のシグナル伝達に重要であると考えられる細胞内ドメインと、単回膜貫通ドメインは共通である。細胞外領域の長さが異なる 2 種類の人工キメラ受容体を設計した理由は、代替リガンドに対する応答性の感度やシグナル伝達の特異性を比較し、より優れたものを採用するためである。

これら 2 種類の人工 G-CSF キメラ受容体はそれぞれ、CAG プロモーターにより誘導され、IRES 配列を介してネオマイシン耐性遺伝子を同時に発現する形で、レンチウイ

ルスベクターを用いてマウス iPS 細胞に導入させた。各遺伝子の導入後に、G418 硫酸塩による細胞選択を行うことで、形質転換された細胞をスクリーニングし、それらを人工 G-CSF 受容体を安定発現する iPS 細胞株として以後の実験に用いた。本論文では、それぞれの iPS 細胞株を、マウス iPS/GCSFRS 細胞及びマウス iPS/GCSFRL 細胞と記述する。

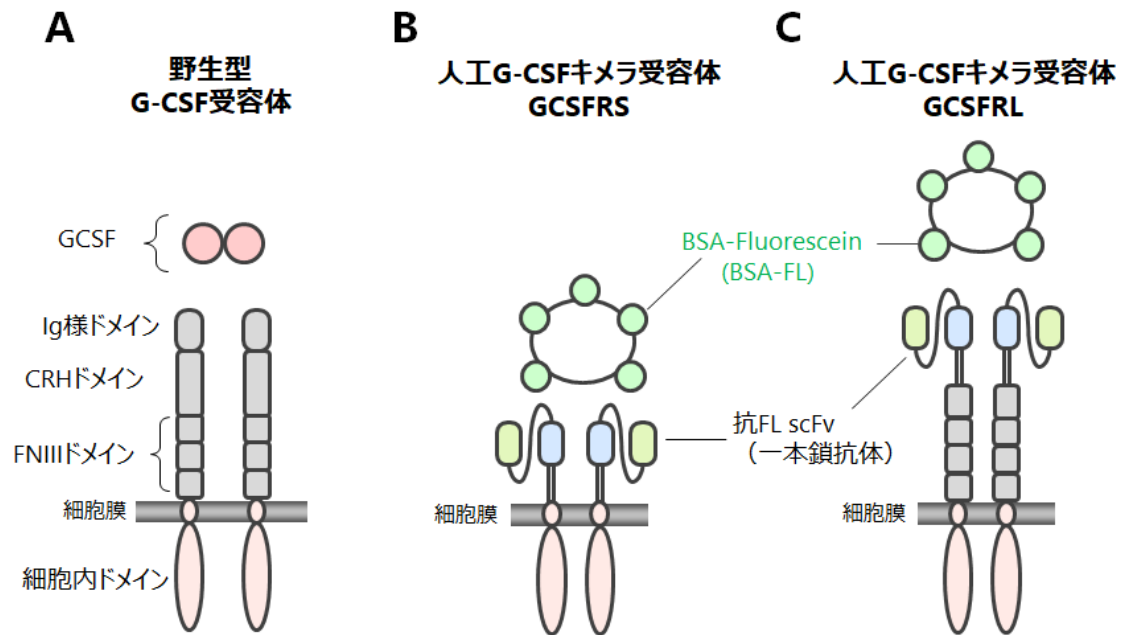


図 7. 内在性及び人工 G-CSF キメラ受容体の模式図

内在性の G-CSF 受容体 (A) 及び本研究で構築した人工 G-CSF キメラ受容体の模式図を示す。GCSFRS は内在性 G-CSF 受容体のもつ細胞外領域全体を欠損させ、代替リガンドである FL に対する scFv に置換した (B)。GCSFRL は内在性 G-CSF 受容体のもつ細胞外のうち Ig 様ドメインのみを欠損させ、同じく抗 FL-scFv を融合させた (C)。

### 3.2. 人工 G-CSF キメラ受容体下流におけるシグナル応答性解析

次いで、リガンド刺激時におけるマウス iPS/GCSFRS 細胞及びマウス iPS/GCSFRL 細胞の細胞内シグナル伝達を解析した。本研究では、FL 分子を BSA にコンジュゲートさせた BSA-FL をリガンドとして用いた。BSA-FL においては、1 分子の BSA に複数の FL 分子が結合している。前述のように、G-CSF 受容体はその二量体化を介して活性化し、シグナル伝達を行うと考えられているため、人工 G-CSF キメラ受容体についても、そのリガンドが受容体の会合を誘導できる必要があると推察される。このような理由から、本研究では多価結合が可能なリガンド分子として BSA-FL を採用した。

まず、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の BSA-FL をマウス iPS/GCSFRS 細胞及びマウス iPS/GCSFRL 細胞に添加した際の、STAT3 リン酸化レベルの時間応答性を解析した。刺激後、0、5、10、15、30、60 分後に細胞サンプルを解析し、Western blotting 法により STAT3 のリン酸化レベルを解析した結果を図 8 に示す。BSA-FL の刺激により、いずれの細胞株においても STAT3 のリン酸化が上昇し、構築した人工 G-CSF キメラ受容体がシグナル活性化機能を有することが示された (図 8A)。なお、この時、人工 G-CSF キメラ受容体を導入していない mock となる iPS 細胞株においては、BSA-FL 刺激による STAT3 リン酸化亢進は認められず (図 8B)、今回確認された STAT3 リン酸化が人工 G-CSF キメラ受容体を介したものであることがわかる。また、いずれの細胞株においても、リン酸化応答のピークは刺激後 10 から 30 分後であり、大きな差は認められなかった。一方で、ピーク時における STAT3 のリン酸化レベルは、マウス iPS/GCSFRS 細胞よりも、マウス iPS/GCSFRL 細胞において高い傾向を示し、CRH ドメイン及び FNIII ドメインを含む細胞外領域が、細胞内でのシグナル惹起効率に寄与している可能性が示唆された。

続いて、マウス iPS/GCSFRS 細胞及びマウス iPS/GCSFRL 細胞における STAT3 シグナル伝達のリガンドに対する濃度依存性を解析した。両細胞株に 0、0.01、0.1、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の BSA-FL を添加し、リン酸化 STAT3 レベルを Western blotting 法により検出した。細胞サンプルは、前述したリン酸化レベルの時間応答性解析の結果から、リン酸化レベル



がピークを迎える時間帯である刺激後 15 分で回収した。また、未分化の iPS 細胞には内在性の G-CSF 受容体は発現しておらず、G-CSF 刺激サンプルを陽性コントロールとして用いることはできないため、陽性コントロールとしては、LIF 刺激を施した細胞サンプルを用いた。結果を図 9 に示す。いずれの細胞株においても、濃度依存的な STAT3 リン酸化シグナルの亢進が認められており、本検討内においては最大濃度である 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の BSA-FL 処置時に最大となった(図 9A)。濃度依存性については、Western blotting の結果をデンストメーターにより解析した際にも同様に確認された(図 9B)。以上のことから、本研究で設計・構築した人工 G-CSF キメラ受容体が、意図したリガンドである BSA-FL に対して、時間応答性及び濃度依存性をもって応答することが示された。

G-CSF 受容体下流における STAT3 シグナル伝達は、JAK と共役することで引き起こされることが分かっている。本研究で確認された BSA-FL 刺激による人工 G-CSF キメラ受容体下流での STAT3 のリン酸化応答が、内在性メカニズムである JAK との共役によるものかを確かめる目的で、JAK 阻害剤(JAK inhibitor I, CAS 457081-03-7, Thompson et al., 2002)の添加実験を行った。十分量の JAK 阻害剤の存在下また非存在下で、BSA-FL 又は LIF 刺激を行ったマウス iPS/GCSFRS 細胞を Western blotting によって解析した。その結果、BSA-FL 又は LIF 刺激によって惹起された STAT3 リン酸化の亢進が JAK 阻害剤によって消失することが確認された(図 10)。これは、人工 G-CSF キメラ受容体の下流においても、内在性受容体もつメカニズムと同様に JAK 依存的なシグナル応答が引き起こされていることを示している。

以上の結果から、抗 FL-scFv をリガンド結合部位にもつ人工 G-CSF キメラ受容体が、BSA-FL を代替リガンドとして、内在性の受容体と同様に、JAK 依存的な STAT3 シグナル伝達を惹起することが可能であることが示された。これは、本研究におけるコンセプトが、シグナル伝達に関連する分子レベルで検証されたことを意味しており、以後の実験では、人工 G-CSF キメラ受容体によるシグナル活性化が心筋分化に影響を及ぼすか否か機能的な検証を行った。

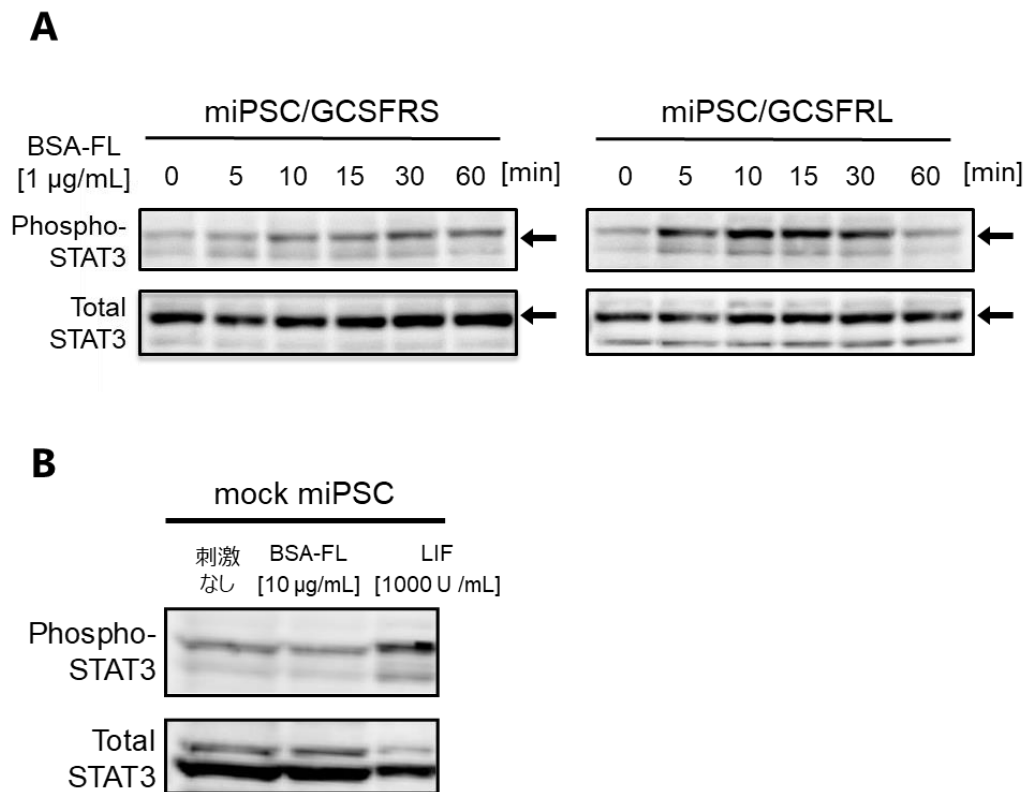


図 8. 人工キメラ G-CSF 受容体導入 iPS 細胞における STAT3 シグナルの時間応答性

(A) 人工 G-CSF キメラ受容体 GCSFRS 及び GCSFRL を導入したマウス iPS 細胞に対し、代替リガンド BSA-FL を作用させた際の、作用時間ごとにおけるリン酸化 STAT3 及び全 STAT3 タンパク質レベルの変化。

(B) mock となる人工 G-CSF キメラ受容体未導入のマウス iPS 細胞におけるリガンド処置時のリン酸化 STAT3 及び全 STAT3 タンパク質レベルの変化。BSA-FL は STAT3 リン酸化亢進作用を示さない。

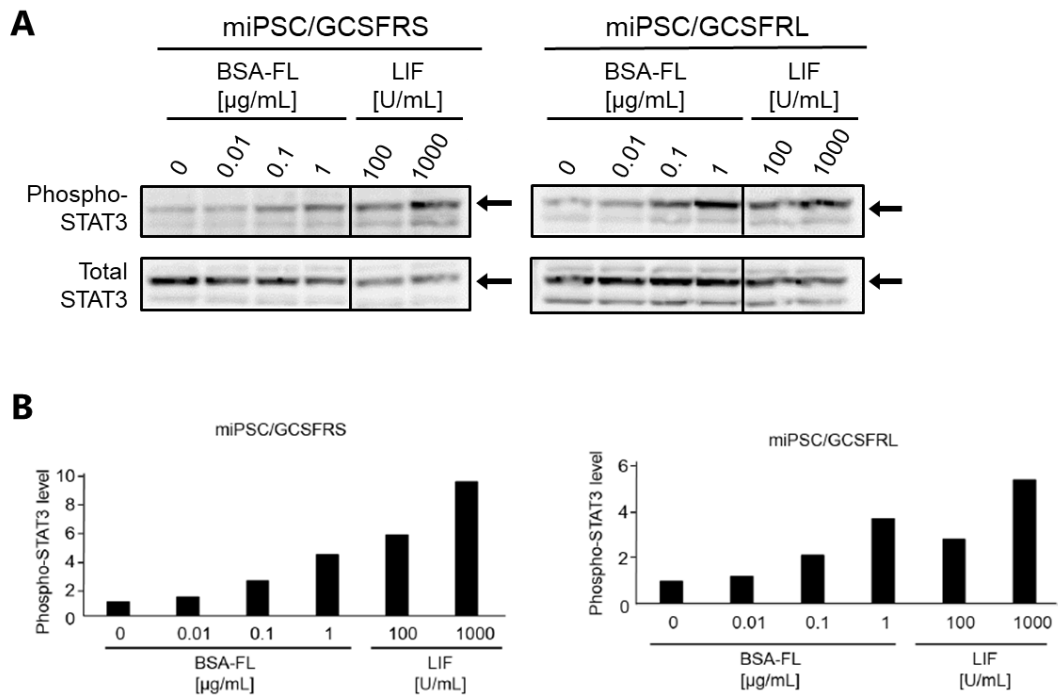


図 9. 人工 G-CSF キメラ受容体導入 iPS 細胞における STAT3 シグナルのリガンド濃度応答性

(A) 人工 G-CSF キメラ受容体 GCSFRS 及び GCSFRL を導入したマウス iPS 細胞に対し、種々の濃度の代替リガンド BSA-FL 及び LIF を作用させた際のリン酸化 STAT3 及び全 STAT3 タンパク質レベルの変化。

(B) 上記 western blotting 像の ImageJ ソフトウェアを用いた定量結果。

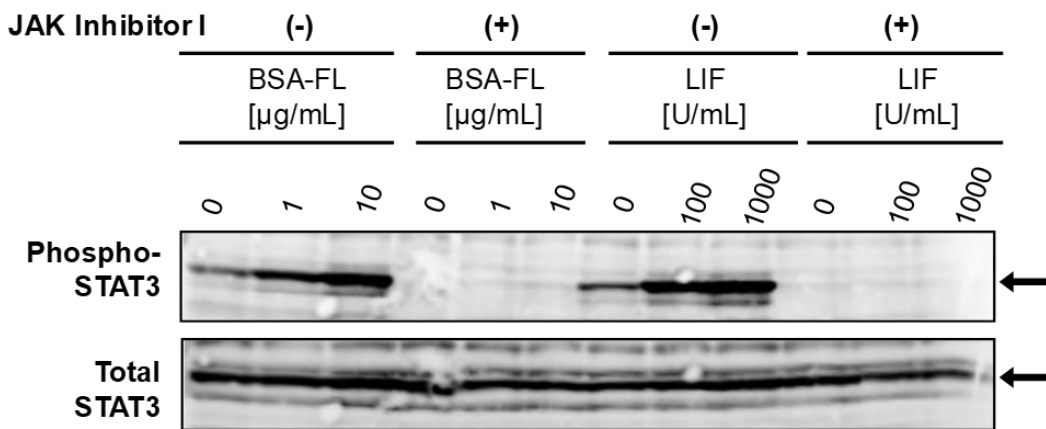


図 10. JAK 阻害剤存在下における人工 G-CSF キメラ受容体導入 iPS 細胞の STAT3 シグナル

人工 G-CSF キメラ受容体 GCSFRS 及び GCSFRL を導入したマウス iPS 細胞に対し、JAK 阻害剤存在下又は非存在下において、種々の濃度の代替リガンド BSA-FL 及び LIF を作用させた際のリン酸化 STAT3 及び全 STAT3 タンパク質レベルの変化。

### 3.3. 人工 G-CSF キメラ受容体を介した心筋分化促進

人工 G-CSF キメラ受容体がリガンド応答性を示したことから、これを安定発現する iPS 細胞株から機能的な心筋細胞が誘導可能か否か、またリガンド添加による分化効率への促進効果の有無について検証した。

マウス iPS/GCSFRS 細胞及びマウス iPS/GCSFRL 細胞の分化誘導は EB 形成により行い、分化誘導の過程において、EB の播種を分化開始の初日として、それぞれ 6、7、8 日目に 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の BSA-FL を 24 時間暴露した。分化開始から 20 日以上を観察を行い、周期的な拍動が観察された EB の割合を自己拍動率として、目視にて計測した結果を **図 11** に示す。マウス iPS/GCSFRS 細胞及びマウス iPS/GCSFRL 細胞ともに、自己拍動する EB が一定の割合で認められており、心筋細胞への分化能を有していることが確認された。また、分化開始から 7 日目に BSA-FL 処置を施すことで、両細胞株で無処置の場合に比較して自己拍動率の向上が確認され (**図 11A** 及び **B**)、特にマウス iPS/GCSFRS 細胞においては、顕著な自己拍動率の上昇が認められた (**図 11A**)。これらの結果から、人工 G-CSF キメラ受容体の導入とリガンド刺激によって、一定条件下で iPS 細胞からの心筋細胞分化を亢進可能であることが示唆された。また、JAK 阻害剤存在下で同様の実験を行った場合、iPS/GCSFRS 細胞において観察された自己拍動率の上昇は消失したことから (**図 11C**)、この現象は JAK の活性化を必須としており、受容体下流の JAK/STAT3 シグナル依存的なものであることが示唆された。なお、マウス iPS/GCSFRL 細胞では、BSA-FL を処置するタイミングによって自己拍動率の上昇度に大きな差は認められなかったが (**図 11B**)、マウス iPS/GCSFRS 細胞においては、分化開始から 6 日目、8 日目での BSA-FL 処置は、逆に自己拍動率を減少させる結果となった (**図 11A**)。このことは、前項で観察された、同濃度のリガンドに対する STAT3 シグナル誘導の程度が人工キメラ受容体間で異なったこと、あるいは分化時期によって、STAT3 シグナルが及ぼす分化効率への影響が異なる可能性を想起させる。

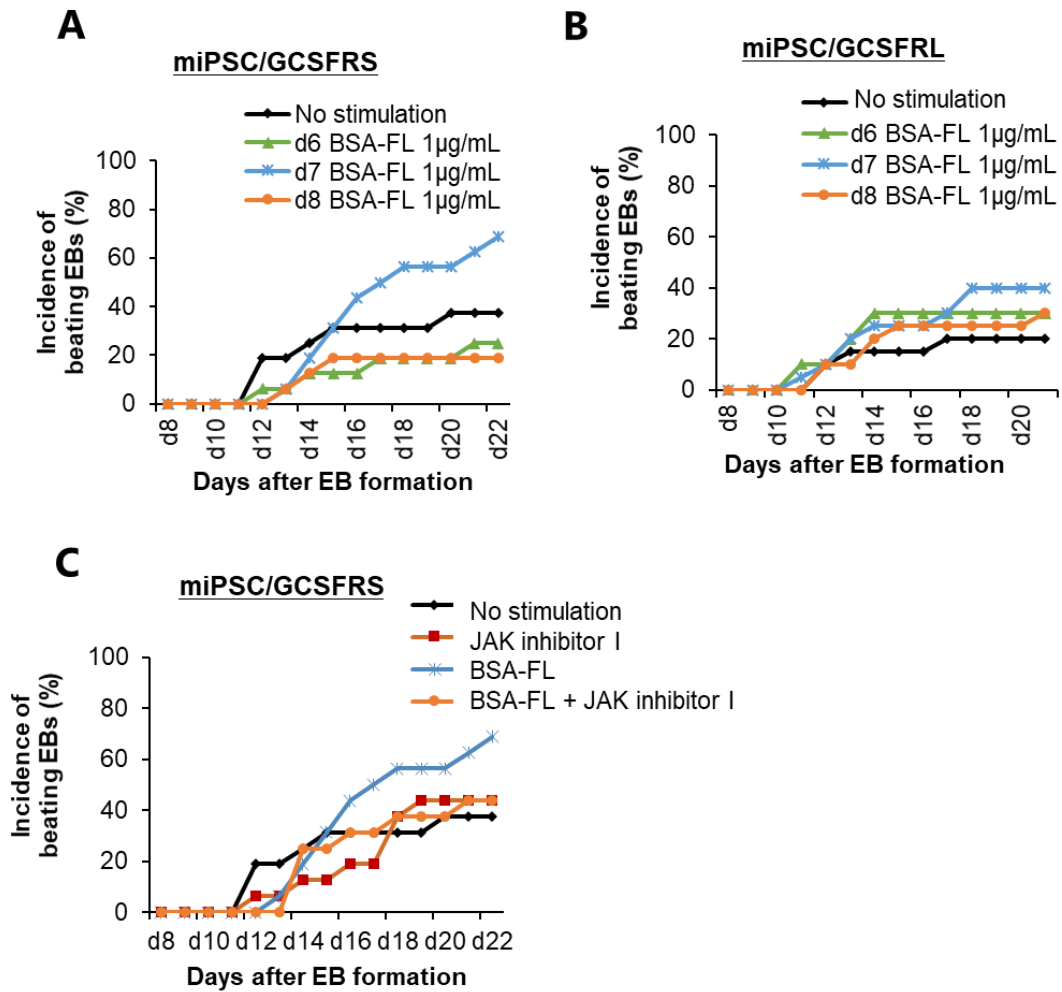


図 11. 人工 G-CSF キメラ受容体を導入したマウス iPS 細胞からの心筋細胞誘導

(A, B) 人工 G-CSF キメラ受容体 GCSFRS 又は GCSFRL を導入したマウス iPS 細胞からの心筋分化誘導に対して、代替リガンド刺激がもたらす効果。自己拍動性を有する細胞の割合を経時的に示す。

(C) 代替リガンド刺激による心筋様細胞の分化促進効果の JAK 阻害剤添加による消失。

### 3.4. 人工 G-CSF キメラ受容体導入 iPS 細胞に由来する心筋細胞の性状解析

最後に代替リガンドと人工キメラ受容体を介したシグナル刺激が分化過程に与える影響を明らかにし、また、結果として得られた人工 G-CSF キメラ受容体を導入した iPS 細胞株から誘導された自己拍動細胞が、目的とする心筋細胞としての特性を備えているかを検証する目的で、得られた自己拍動細胞、あるいはその誘導過程にある細胞群について種々の特性解析を行った。なお、以降の検討は、BSA-FL 刺激による自己拍動率の上昇が顕著であったマウス iPS/GCSFRS 細胞株を用いて行った。

まず、分化誘導過程における遺伝子の発現解析を定量 RT-PCR 法により施行した。心筋マーカー遺伝子に加え、BSA-FL 刺激による影響を網羅的に検討するため、心筋マーカー以外の中胚葉マーカー遺伝子、内胚葉マーカー遺伝子、外胚葉マーカー遺伝子についても解析を行った。EB 播種後 7 日目に 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の BSA-FL を 24 時間処置したのちに、培養を継続した 22 日目の細胞サンプルを回収し、リアルタイム PCR 法を用いた分化マーカー遺伝子の発現解析を行った結果を図 12 に示す。幼若な心筋マーカー遺伝子のうち、 $\beta$ -MHC 遺伝子、*Nkx2.5* 遺伝子の発現には、BSA-FL 処置の有無によって有意な発現の変動は確認されなかった。一方で、*Tbx5* 遺伝子や、幼若心筋と成熟心筋の両方のマーカーである *Gata4* 遺伝子、成熟心筋のマーカーである *cardiac  $\alpha$ -actinin* 遺伝子、 $\alpha$ -MHC 遺伝子の発現は、BSA-FL 処置により有意に上昇していた (図 12A)。この時、その発現上昇効果は、JAK 阻害剤により打ち消された。このことから、iPS/GCSFRS 細胞の分化誘導過程における BSA-FL 刺激は、JAK/STAT3 シグナル依存的に心筋マーカー遺伝子の発現を上昇させることが明らかとなり、それが心筋様の自己拍動細胞への分化効率上場に寄与している可能性が示唆された。また、心筋以外の中胚葉マーカーについても解析した結果、血球系マーカー遺伝子として用いられる *Gata1* や *Gata3*、血管系マーカー遺伝子として用いられる  $\alpha$ -SMA、*VE-Cad*、骨軟骨系マーカー遺伝子として用いられる *Osx*、*Runx* については、BSA-FL 処置による有意な変動を示さなかった (図 12B)。*Afp*、*Pdx1*、*Pax6* といった一部の内胚葉マーカー遺伝子や、*Nestin* や *NeuroD1* といった外胚

葉マーカー遺伝子は、BSA-FL 処置によって発現が低下した (図 12C 及び D)。以上のことから、BSA-FL 処置により惹起される人工 G-CSF キメラ受容体を介した作用は、心筋マーカーの発現亢進だけにとどまらず、分化指向性をもつ協調的な発現制御を示す可能性が示唆された。

次いで、人工 G-CSF キメラ受容体を導入した iPS 細胞から誘導された自己拍動性の心筋様細胞について、免疫組織化学的な解析を行った。分化心筋の分子マーカーである cardiac  $\alpha$ -actinin タンパク質に対する抗体を用いて、EB 播種後 21 日経過した細胞について免疫染色を施した像を図 13 に示す。BSA-FL を処置していない状態でも、自己拍動が観察された箇所には cardiac  $\alpha$ -actinin の陽性シグナルが認められ、心筋様に分化していることが確認された。BSA-FL 処置を施したものについては、よりそのシグナルが顕著であり、分化亢進効果が認められた。さらに、シグナル強度が顕著である箇所には、心筋における機能構造体であるサルコメア様の観察像が認められた。サルコメアは筋節とも呼ばれ、横紋筋において筋原線維を構成する最小単位である。筋原線維には、構成分子と構造に由来する明度の異なる帯域 (明帯と暗帯) が交互に整列しており、明帯と暗体の中央には Z 線が走行している。今回の観察像においても、線維に沿う形で典型的な帯構造の繰り返しが観察されている。この分化亢進作用は、JAK 阻害剤の処置によって打ち消されたことから、これまでの検討同様、JAK/STAT3 シグナルの誘導を介していることが示唆された。これらのことから、BSA-FL 処置により人工 G-CSF キメラ受容体を介して引き起こされる分化誘導作用が、JAK/STAT3 を介して、単なる分子マーカーの発現亢進だけでなく心筋細胞としての機能的な作用をもたらすものであることが示された。

形態学的にも心筋様の構造が確認されたことから、人工 G-CSF キメラ受容体を導入した iPS 細胞から誘導された自己拍動性の心筋様細胞について、生理学的な機能面における解析を行った。具体的には、心筋に特徴的な表現型であるカルシウムオシレーションの可視化を試みた。心筋細胞は、活動電位の変化によって引き起こされる細胞質内の



カルシウムイオン濃度が上昇する、カルシウムトランジェントと呼ばれる動きを示す。カルシウムイオンの変動は、正常な心筋においては組織内で協調的かつ反復的なオシレーションとして発生し、一定間隔で起こる心筋収縮に対応するとされている (Bers, 2002)。活動電位あるいはカルシウムイオンの流入の測定を個別の細胞で実施し、それらの協調性を解析するには技術的な困難さが伴うため、カルシウムイオンに対する蛍光インディケータを用いたカルシウムイメージングによる間接的な可視化を行った。蛍光インディケータには、カルシウムイオンの結合により蛍光強度が大きく変化することで知られる Fluo-8 を用いた (Manabe et al., 2012)。人工 G-CSF キメラ受容体を導入した iPS 細胞由来の EB を播種後、自己拍動性を有する細胞塊が観察される時期において、Fluo-8 を添加し、これを細胞内に取り込ませた (図 14A 及び B)。蛍光観察の結果、自己拍動を呈する領域においては、協調した蛍光強度の変動が反復して観察された。特定の領域に着目して、蛍光強度を時間経過とともに定量化した結果を図 14C に示す。一定の振幅をもった蛍光強度の変化が波形として捉えられており、定量化の結果からも、当該細胞塊内でカルシウムオシレーションが引き起こされていることが示された。

以上のことから、人工 G-CSF キメラ受容体を導入した iPS 細胞から誘導された自己拍動性の心筋様細胞は、分子マーカー、機能的構造、表現型のいずれの面からも心筋細胞としての特徴を示しており、心筋としての分化が裏付けられた。また、それらの分化は、代替リガンドである BSA-FL 刺激により、JAK/STAT3 依存的なシグナル伝達を介して亢進させることが可能であり、本研究のコンセプトである、人工キメラ受容体を効率的に心筋分化誘導法に応用することが可能であることを示す結果となった。

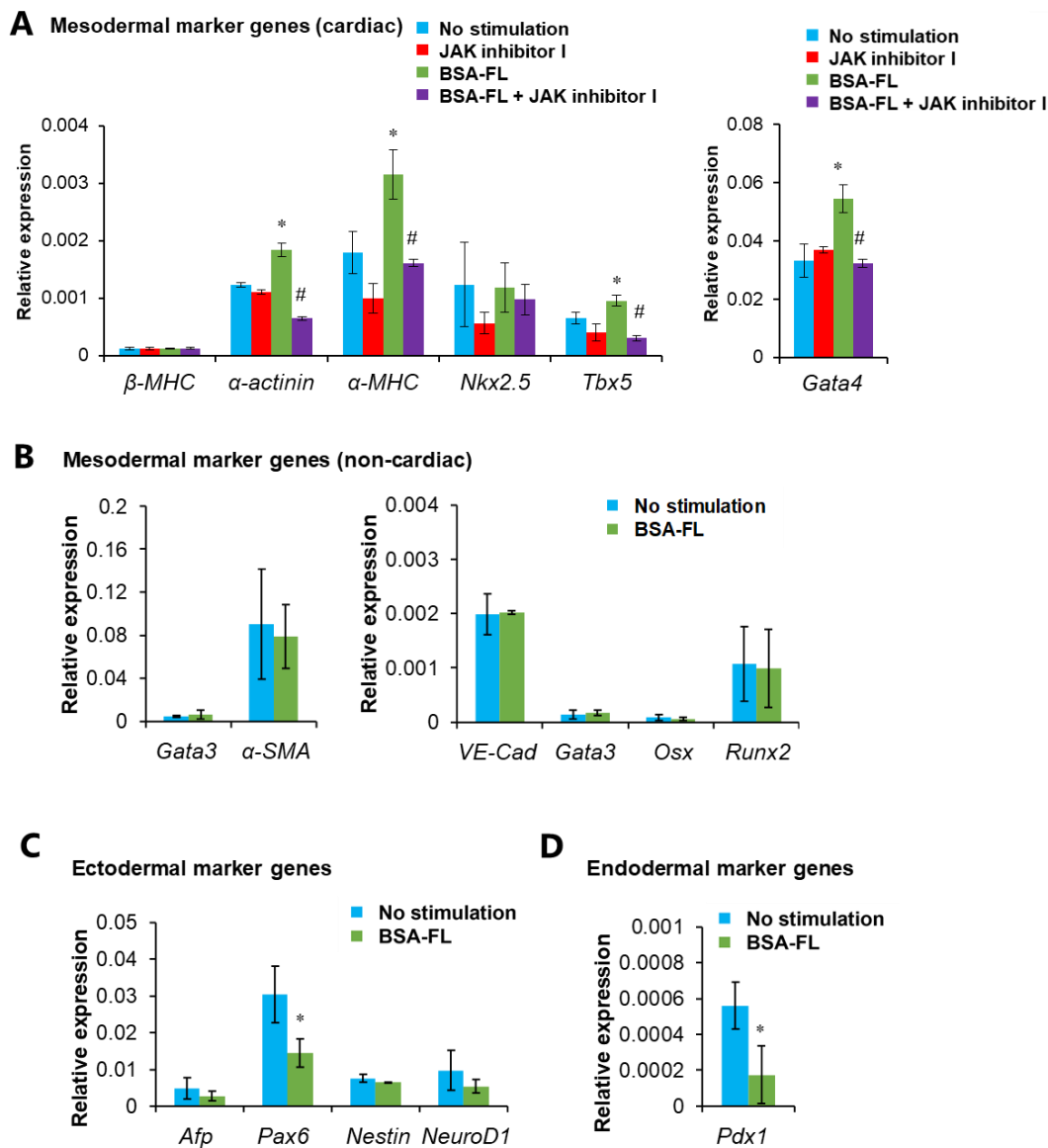


図 12. 人工 G-CSF キメラ受容体導入 iPS 細胞由来心筋様細胞の遺伝子発現解析

人工 G-CSF キメラ受容体を導入した iPS 細胞由来の心筋細胞における (A) 心筋関連マーカー遺伝子、(B) 心筋以外の中胚葉マーカー遺伝子、(C) 外胚葉マーカー遺伝子及び (D) 内胚葉マーカー遺伝子の発現レベル。\*無刺激時に対して  $p < 0.05$ 、#BSL-FL 刺激時に対して  $p < 0.05$ 、エラーバーは S.D. を示す。

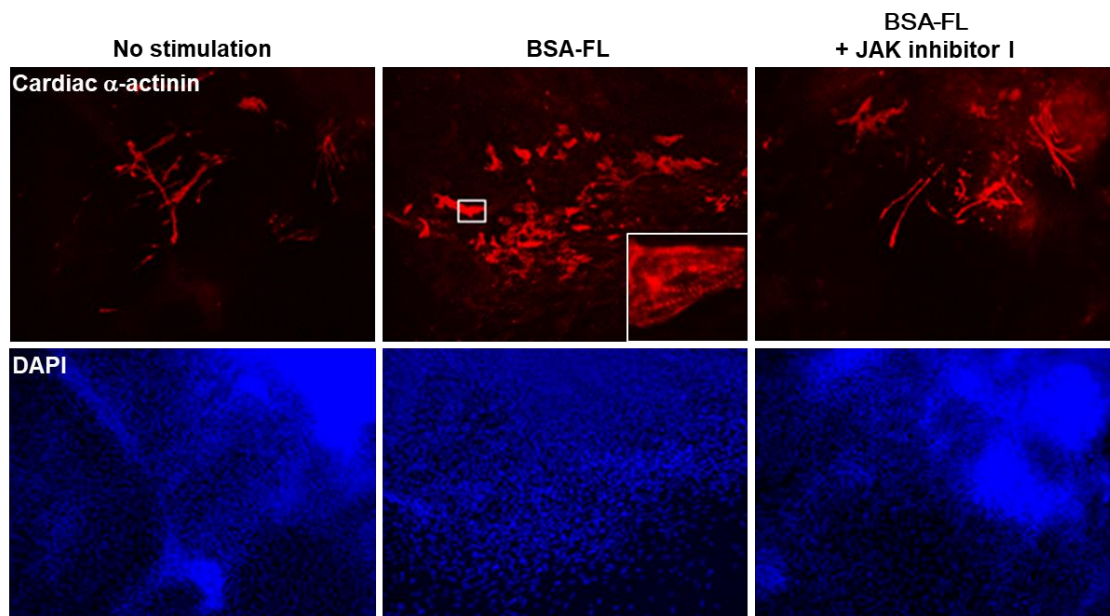


図 13. 人工 G-CSF キメラ受容体導入 iPS 細胞由来心筋細胞の免疫組織化学的解析

BSA-FL 刺激下又は非刺激下における人工 G-CSF キメラ受容体を導入したマウス iPS 細胞由来の心筋様細胞が呈する cardiac  $\alpha$ -actinin の免疫染色像 (対物 10 倍)。白枠内にサルコメア構造を認める強角像を示す (対物 40 倍)。

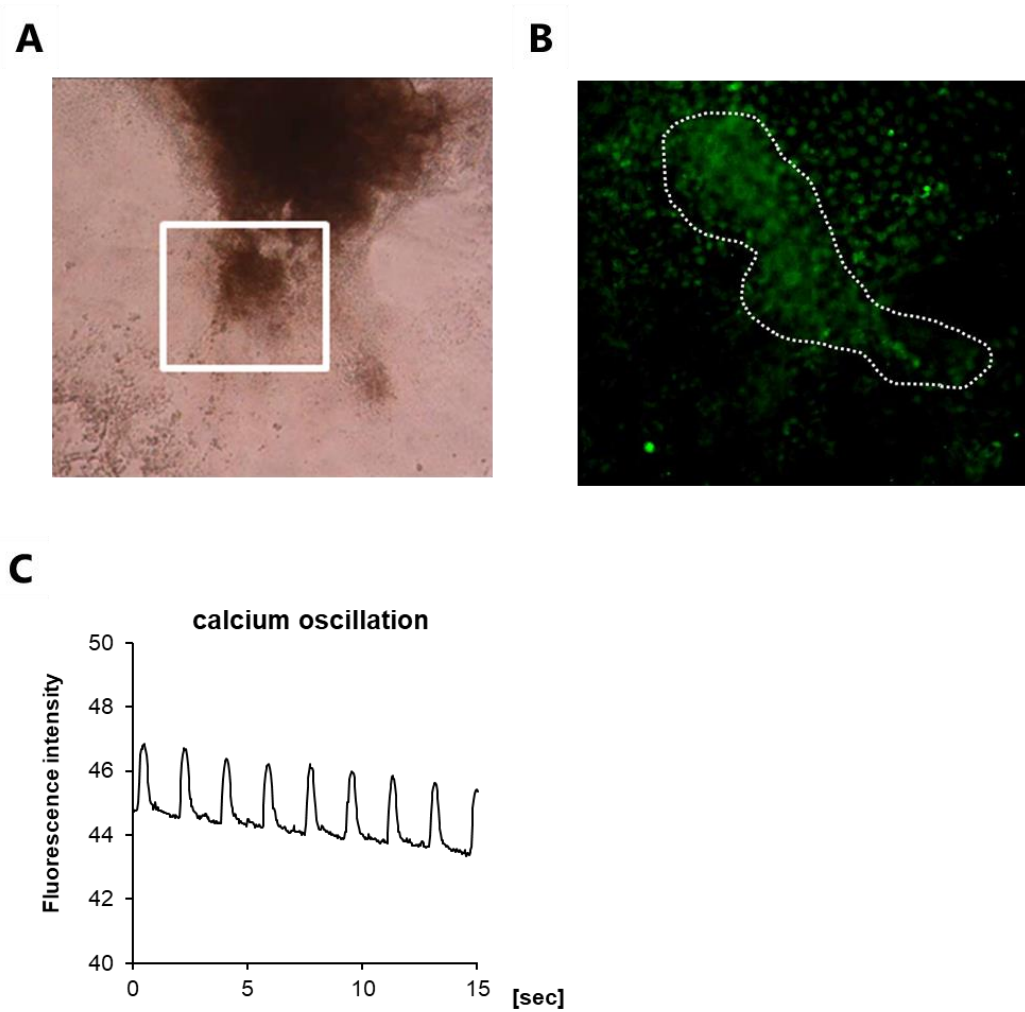


図 14. 人工 G-CSF キメラ受容体を導入した iPS 細胞由来心筋様細胞のカルシウムイメージング

自己拍動性を示す人工 G-CSF キメラ受容体を導入したマウス iPS 細胞由来の心筋様細胞の明視野での観察像 (A、拍動部分を白線で示す)、カルシウム指示薬 Fluo-8 取り込み後の細胞観察像 (B、拍動部分を白点線で示す)、自己拍動に伴う蛍光強度の周期的変化 (C) を示す。

## 第4章 考察

### 4.1. 人工 G-CSF キメラ受容体の可能性

本研究では、BSA-FL 分子を代替リガンドとして、G-CSF 受容体下流のシグナル伝達を模倣可能な人工 G-CSF キメラ受容体を、抗 FL 抗体の抗原結合部位と G-CSF 受容体を融合させることで作製した。本研究の概要を図 15 に示す。細胞外領域に含まれるドメインが異なる GCSFRS、GCSFRL とともに、iPS 細胞に導入することでリガンド依存的な STAT3 のリン酸化を亢進させ、心筋細胞の分化誘導効率を上昇させた。また、BSA-FL リガンド刺激により、心筋分化に関与することが知られている種々の転写因子や、心筋構造タンパク質をコードする遺伝子の発現亢進が認められ、その作用は心筋に関連しない他の中胚葉に対する分化マーカーの発現に対しては影響しないという選択性を有していた。逆に、一部の内胚葉、外胚葉に対する分化マーカーの発現は抑制されたことから、人工 G-CSF キメラ受容体からのシグナル活性化による分化促進作用は心筋細胞への指向性を有していることが示唆された。今回採用した BSA-FL のコストは、精製 G-CSF タンパク質に比較して、概算で 20 分の 1 程度に抑えることが可能であることから、本研究で開発された BSA-FL/人工 G-CSF キメラ受容体を iPS 細胞からの心筋分化誘導に応用することで、より安価なリガンドで特異的なシグナル伝達誘導を介した心筋細胞の調製が可能となる。これは iPS 細胞の医療応用の大きな課題の 1 つである経済性の課題に対して、一定の寄与を示すものであると考えられる。

本研究において開発した細胞外領域の構造が異なる 2 種類の人工キメラ受容体 GCSFRS と GCSFRL は、いずれもリガンド依存的に STAT3/JAK シグナルを惹起し、各々を導入したマウス iPS 細胞からの心筋分化誘導を促進したが、その程度には違いがみられた。具体的には、GCSFRS を導入したマウス iPS 細胞由来における心筋分化促進作用が、GCSFRL を導入したマウス iPS 細胞よりも強く観察された。一方で、第 3 章 3.2 項において図 8 に示したように、リガンド刺激時における STAT3 シグナルの伝達強度は、

GCSFRL を導入したマウス iPS 細胞においてより強い結果であった。実際に、リガンド刺激時におけるリン酸化 STAT3 シグナルの定量結果において、1000 U/mL での LIF 刺激時のリン酸化 STAT3 シグナル強度を 100%とした際に、GCSFRS を導入したマウス iPS 細胞においては未刺激の基底状態が 10%、1  $\mu$ g/mL の BSL-FL 刺激時が 46%程度であるのに対し、GCSFRL を導入したマウス iPS 細胞においては、それぞれ 19%、69%であった。このことは、GCSFRS が GCSFRL に比較してより厳密に G-CSF による STAT3 シグナル伝達を反映している可能性を示唆している。過去の研究において、過剰な STAT3 シグナルはむしろ心筋分化を阻害することが示されており (Shimoji et al., 2010)、心筋分化の誘導においては適切な強度の STAT3 シグナルを誘導することが肝要であるといえる。

本研究において代替リガンドとして採用した BSA-FL は、生体試料である本来のリガンド G-CSF に比較して、調製に係るコストが安価だけでなく、化学的にも安定であり、保存面においてもアドバンテージを有することが想定される。また、本来シグナル伝達においては生理活性を有さない分子で構成されていることから、生体に暴露された際にも意図した作用以外の副次的効果をもたらす可能性も極めて低い。ただし、異種の BSA タンパク質には抗原性が否定できないため、医療応用の際にはより安全なリガンドを考慮する必要がある。G-CSF 受容体の活性化には、その二量体化が必要であることから、最も単純なリガンドとしては FL 分子のダイマーであると考えられる。実際に、オリゴ DNA リピートをリンカーとした FL ダイマーが過去の研究において使用された例があり (Kawahara et al., 2004; Sogo et al., 2008)、免疫原性がなく、生体内投与の際にも、より良好な拡散性の動態を示すことが報告されている。

動物モデルを用いた過去の研究において、G-CSF の投与により、急性心筋梗塞後における心室リモデリングや機能不全の発生が抑制されることが報告されている (Harada et al., 2005)。これには、G-CSF が心筋細胞に対し抗アポトーシス作用を示すこと、新生血管の形成促進作用を有することが関与しているとされる。このように、G-CSF 受容体及

びその下流にある JAK/STAT3 シグナルが、多能性幹細胞からの心筋の分化促進作用だけでなく、生体においても有用な作用を示すことを考慮すると、本研究で開発された人工 G-CSF キメラ受容体を心疾患治療として生体内でも機能させることで、体系的な価値提供が可能と考えられる。つまり、人工 G-CSF キメラ受容体を導入した iPS 細胞から作製した心筋細胞を心疾患患者へ移植した後に、代替リガンドを投与することで、移植細胞群の生存性を高めつつ定着を促すことができる。その際、代替リガンドによる作用は移植細胞に限定されるため、G-CSF の副作用に対する懸念は払しょくすることが可能である。想定されるスキームを図 16 に示す。このように、本研究において開発された人工 G-CSF キメラ受容体を中心としたシステムは、多能性幹細胞の医療応用における複数の課題解決に寄与し得る可能性を有している。

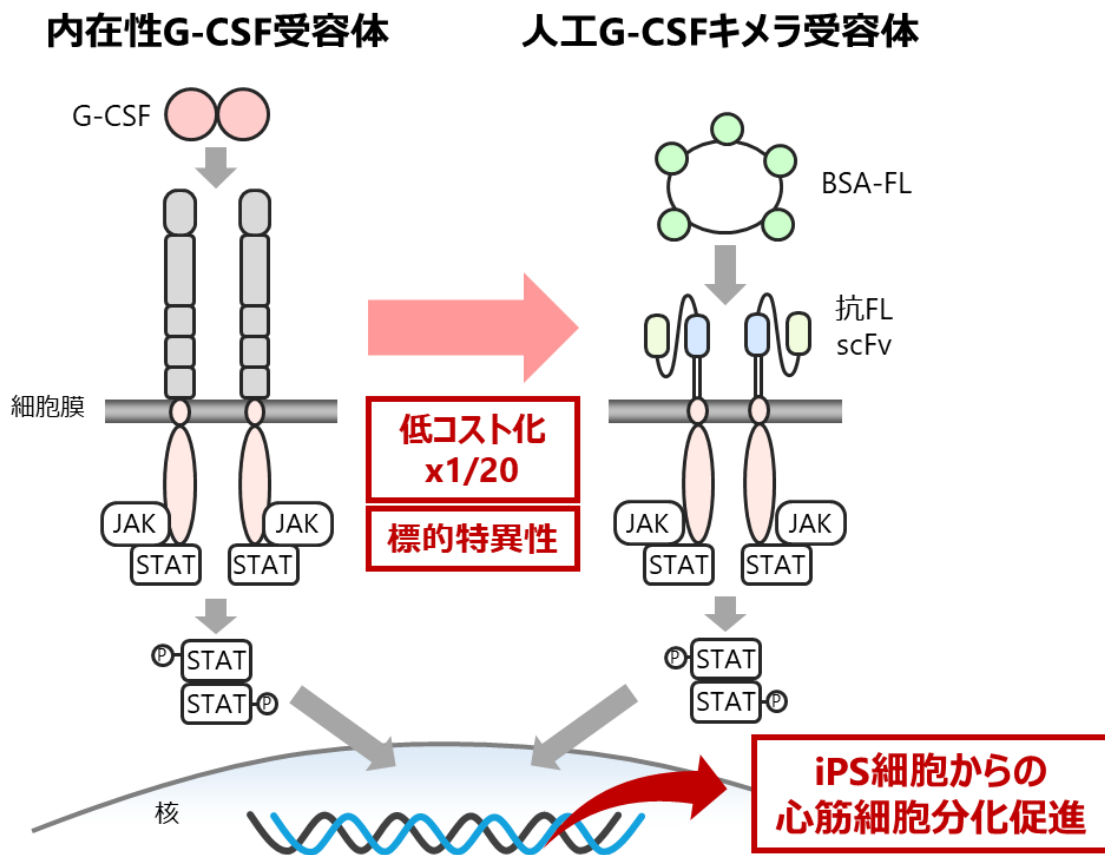


図 15. 本研究の概要

本研究で構築された人工 G-CSF キメラ受容体は、代替リガンド BSA-FL 依存的に、内在性の JAK/STAT3 シグナルを惹起した。また、代替リガンド刺激により、心筋分化に関連するマーカー遺伝子の発現を誘導し、自己拍動性を有する心筋細胞の分化効率を亢進させることに成功した。iPS 細胞から目的細胞を分化誘導する際に、人工キメラ受容体を応用可能であることが示唆された。



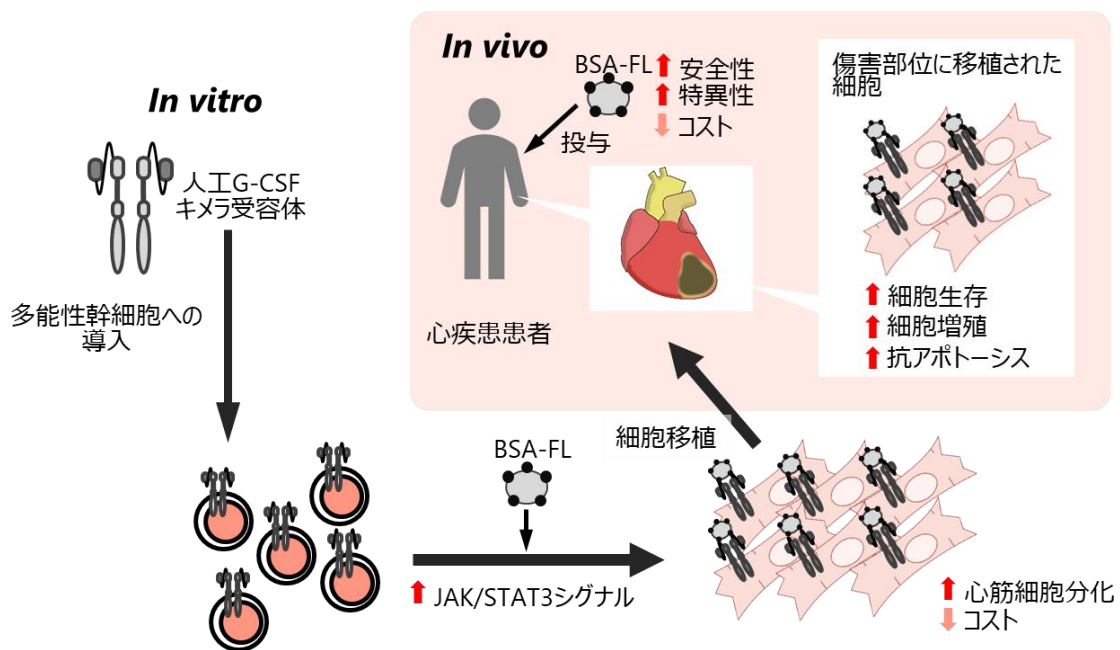


図 16. 本研究の応用と展望

本研究で得られた結果から想定される応用の可能性について模式図として示す。人工 G-CSF キメラ受容体と安価かつ化学的に安定な代替リガンドを応用することで、iPS 細胞から経済的な心筋細胞の調製が可能となる。従来は生理活性を有さない分子である代替リガンドは、副作用なく生体投与が可能であることから、iPS 細胞由来の目的細胞の移植後に、生着を促すなどの目的で用いることも可能と想定される。

## 4.2. 人工キメラ受容体の応用について

人工受容体を用いた細胞制御については、いくつかの先行研究が存在する。例えば、河原らにより、複数のサイトカインに対する人工キメラ受容体が構築され、下流に存在する MEK : Mitogen-activated protein kinase kinase、ERK : Extracellular Signal-regulated Kinase、AKT、STAT3 といったシグナル分子の制御に関して報告がなされている (Kawahara et al., 2014; Kawahara et al., 2008; Tanaka et al., 2009)。また、EpoR : erythropoietin receptor と gp130 のヘテロ型人工キメラ受容体も開発されており、それらを介して下流シグナルである JAK/STAT3 シグナルが制御可能であることも報告されている (Kawahara et al., 2001)。これら先行研究は、主に細胞の増殖や遊走といった機能に着目して、工学的に開発されてきた経緯をもつ。本研究の結果は、人工キメラ受容体を細胞分化へ応用できる可能性を示す新規性の高いものであり、人工キメラ受容体開発の波及効果を広く実証した点においても重要な成果といえる。

上述した先行研究以外に、近年、人工キメラ受容体の応用として著しい発展を遂げているのが、細胞移植療法の一つである CAR-T 細胞療法の領域である。CAR-T 細胞療法は、T 細胞に特定の抗原に対する CAR を発現させ、CAR が結合する標的抗原を発現する細胞に対して特異的に免疫応答が生じることを目的とした免疫療法の一つである (図 17)。例えば、がん抗原特異的な scFv を有する scFv を導入することで、がん細胞に結合した CAR-T 細胞による免疫メカニズムによるがん治療が試みられている。

2020 年までに、二つの CAR-T 細胞療法が承認されており、それに続く候補品として 100 以上の開発が進められている。現在、製品化されている CAR-T 細胞療法について表 5 に示す。CAR-T 細胞療法は、がんの表面抗原に対する研究やゲノム編集技術の成熟に伴って更なる改変がなされており、今後の発展に期待が寄せられる。一方で、課題の一つはやはりコスト面であり、その治療費は 3000 万円以上といわれている。そのうち大きな割合を示すと考えられるのが、細胞調製のコストである。承認済みの CAR-T 細胞療法については、いずれも患者由来の自家細胞を用いているためオーダーメイドに

近く、細胞加工の過程におけるコストが高いことが想定される。治療に用いる細胞については、患者由来の自家細胞から他家細胞や iPS 細胞由来の T 細胞へと安定供給のための様々なアプローチも検討されるなど (Ueda and Kaneko, 2020; Waseda and Kaneko, 2020)、課題解決のための研究が進行中である。

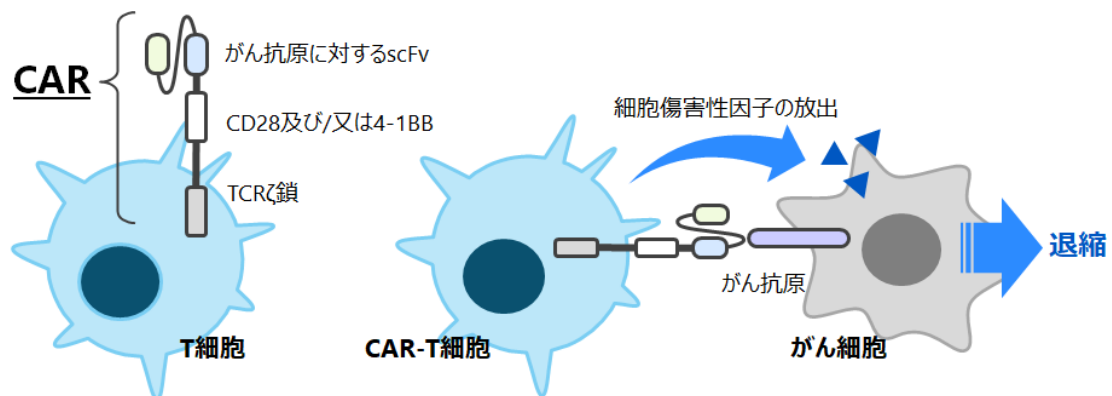


図 17. CAR-T 細胞療法

細胞傷害性 T 細胞に、がん抗原特異的な scFv 断片を有する CAR を導入することで、抗原特異的に T 細胞が活性化され、がんに対する傷害性が発揮される。細胞増殖性を有する十分量の CAR-T 細胞を生体に投与することで、効果的な治療効果が期待される。

表 5. 承認済みの CAR-T 細胞療法

開発企業	開発品名	細胞の由来	標的がん抗原	対象疾患
Novartis	Kymriah	自家	CD19	前駆B細胞性急性リンパ芽球性白血病(小児及び若年成人)
Gilead Sciences (Kite Pharma)	YESCARTA	自家	CD19	成人大細胞型B細胞リンパ腫

### 4.3. 多能性幹細胞と再生医療の将来展望

最後に、多能性幹細胞を用いた再生医療の現状と、今後の展望について述べる。まず、ES 細胞を用いた細胞医薬品として、臨床開発が進められているものの例を表 6 に示す。臨床試験の段階にあるものが多く見受けられるものの、倫理的課題のハードルや供給の困難さなどの理由から、後述する iPS 細胞を用いた臨床応用検討に比べると、臨床試験前の初期検討への参入は少数にとどまるようである。内容としては、網膜変性疾患や脊髄損傷に対する細胞の補完を目的としたもの、代謝性疾患である糖尿病などでインスリン産生を狙ったカプセル型の細胞製剤なども含めて ES 細胞を用いた細胞医薬品の開発が進められている。実際に製品として承認を得られるかどうか、今後の注目が必要である。

次に、iPS 細胞を用いた細胞医薬品の開発状況についても、同様に例を表 7 に示す。ES 細胞を用いたものに比較すると、ステージとしては早期のものが多いが、臨床段階にあるものが複数見受けられる。また、非臨床段階ものも含めると案件数としては多く存在し、研究が旺盛化していることが伺える。対象疾患についても、心疾患、神経変性疾患に加え、腎症や線維症など多様な疾患に対する開発が進められている。今後の開発の進捗やさらなる展開が、大きく期待される。

このような細胞医薬品の開発をはじめとする再生医療の興隆に伴い、これまで述べてきた細胞供給の経済的、安定的供給といった課題の克服に加え、より高度な医療的価値を提供するための技術的な基盤構築が望まれている。例えば、多能性幹細胞由来の分化細胞を細胞医薬品として投与することを考えた場合、基本的には生体内への生着を前提としている。生体内で移植細胞の分裂や生存を維持させることで、長期間にわたり生着し機能が発揮されると期待される一方で、低分子医薬品や抗体といったバイオ医薬品のような半減期に伴う機能消失を予測することは難しい。場合によっては、非常に長い半減期を呈する可能性も考えられる。このことは、予期せぬ副作用に繋がる作用が顕在化した際にも、経時的な消失を期待できないことを意味している。他家細胞や加工細胞

を用いる細胞医薬品は、免疫拒絶を誘発する可能性も考慮する必要があり、長期生着による影響は無視することができない。このような理由から、投与後に生着した細胞群を生体内でコントロールする技術の開発も重要課題と考えられる。生体内での細胞制御技術は、副作用の低減だけでなく、移植細胞を生体内で増殖・分化・成熟させその機能を賦活させるなど、細胞治療の有効性を向上させる面でも有用である。この技術を実用化するには、可能な限り宿主細胞には影響を与えず、移植細胞のみに作用を及ぼす必要がある、特異性の面で高い配慮が必要となる。例えば、副作用の低減を目的とする場合には、特異的抗原を移植細胞に導入しておき、抗原に対する抗体を導入することで、抗体依存的に細胞を傷害、排除するといったアプローチが想定される。細胞機能の賦活化や細胞分化の促進に関しては、サイトカインのような宿主細胞にも影響を及ぼすような生理活性物質を用いることはできないため、本研究でも用いた人工キメラ受容体による制御が非常に有望である。代替リガンドとして、生理活性をもたない分子を設定することにより、安全性を確保しつつ移植細胞の制御を実現できる可能性が期待される。このように、人工キメラ受容体をはじめとする新規技術基盤を応用することで、より高い有効性と安全性を有する再生医療製品の開発が強く期待される中、本研究において得られた知見は意義の大きいものであるといえる。

表 6. ES 細胞を用いた主な細胞医薬品

開発品名	開発元	使用細胞	対象疾患	開発段階	情報ソース
ASP7317	アステラス製薬	網膜色素上皮細胞 (ES 細胞由来)	シユタルガルト病	phase II	<a href="https://www.astellas.com/jp/ja/science/pipeline">https://www.astellas.com/jp/ja/science/pipeline</a>
OpRegen	Lineage Cell Therapeutics	網膜色素上皮細胞 (ES 細胞由来)	加齢性黄斑変性症	phase I/II	<a href="https://lineagecell.com/products-pipeline/">https://lineagecell.com/products-pipeline/</a>
OPC1	Lineage Cell Therapeutics	希突起膠細胞前駆細胞 (ES 細胞由来)	脊髄損傷	phase I/II	<a href="https://lineagecell.com/products-pipeline/">https://lineagecell.com/products-pipeline/</a>
PEC-Direct™ (VC-2)	ViaCyte	脾臓内胚葉細胞 (ES 細胞由来)	I 型糖尿病	phase I/II	<a href="https://viacyte.com/pipeline/">https://viacyte.com/pipeline/</a>
PEC-Encap™ (VC-1)	ViaCyte	脾臓内胚葉細胞 (ES 細胞由来)	I 型糖尿病	phase I/II	<a href="https://viacyte.com/pipeline/">https://viacyte.com/pipeline/</a>
VAC2	Lineage Cell Therapeutics	樹状細胞 (ES 細胞由来)	非小細胞肺癌がん	phase I	<a href="https://lineagecell.com/products-pipeline/">https://lineagecell.com/products-pipeline/</a>

表 7. iPS 細胞を用いた主な細胞医薬品

開発品名	開発元	使用細胞	対象疾患	開発段階	情報ソース
—	大日本住友製薬	ドパミン 神経前駆細胞 (iPS 細胞由来)	パーキンソン病	phase I/II (医師主導)	大日本住友製薬統合報告書 2020
FT500	Fate Therapeutics	NK 細胞 (iPS 細胞由来)	固形がん	phase I	<a href="https://fatetherapeutics.com/pipeline/">https://fatetherapeutics.com/pipeline/</a>
FT516	Fate Therapeutics	NK 細胞 (iPS 細胞由来)	急性骨髄性白血病	phase I	<a href="https://fatetherapeutics.com/pipeline/">https://fatetherapeutics.com/pipeline/</a>
CYP-001	Cynata Therapeutics	間葉系幹細胞 (iPS 細胞由来)	移植片対宿主病	phase I	<a href="https://www.cynata.com/graftversushostdisease">https://www.cynata.com/graftversushostdisease</a>
—	ケイファーマ	神経幹細胞 (iPS 細胞由来)	脊髄損傷 (亜急性期)	臨床研究	<a href="https://kpharma.co.jp/technology/">https://kpharma.co.jp/technology/</a>
—	大日本住友製薬	神経前駆細胞 (iPS 細胞由来)	脊髄損傷	臨床研究	大日本住友製薬統合報告書 2020
—	BlueRock Therapeutics	ドパミン神経細胞 (iPS 細胞由来)	パーキンソン病	非臨床	<a href="https://bluerocktx.com/pipeline/">https://bluerocktx.com/pipeline/</a>
—	BlueRock Therapeutics	心筋細胞 (iPS 細胞由来)	心筋梗塞・心不全	非臨床	<a href="https://bluerocktx.com/pipeline/">https://bluerocktx.com/pipeline/</a>
—	BlueRock Therapeutics	マクロファージ (iPS 細胞由来)	線維化	非臨床	<a href="https://bluerocktx.com/pipeline/">https://bluerocktx.com/pipeline/</a>
FT596	Fate Therapeutics	NK 細胞 (iPS 細胞由来)	血液がん	非臨床	<a href="https://fatetherapeutics.com/pipeline/">https://fatetherapeutics.com/pipeline/</a>
FT538	Fate Therapeutics	NK 細胞 (iPS 細胞由来)	多発性骨髄腫	非臨床	<a href="https://fatetherapeutics.com/pipeline/">https://fatetherapeutics.com/pipeline/</a>
FT819	Fate Therapeutics	NK 細胞 (iPS 細胞由来)	血液がん	非臨床	<a href="https://fatetherapeutics.com/pipeline/">https://fatetherapeutics.com/pipeline/</a>
CYP-002	Cynata Therapeutics	間葉系幹細胞 (iPS 細胞由来)	重症下肢虚血	非臨床	<a href="https://www.cynata.com/critical-limb-ischemia">https://www.cynata.com/critical-limb-ischemia</a>



表 7. 続き

開発品名	開発元	使用細胞	対象疾患	開発段階	情報ソース
HLCR011	へリオス	網膜色素上皮細胞 (iPS 細胞由来)	加齢性黄斑変性症 (湿式)	非臨床	<a href="https://www.healios.co.jp/development/ipsc/">https://www.healios.co.jp/development/ipsc/</a>
HLCR012	へリオス	網膜色素上皮細胞 (iPS 細胞由来)	加齢性黄斑変性症 (乾式)	非臨床	<a href="https://www.healios.co.jp/development/ipsc/">https://www.healios.co.jp/development/ipsc/</a>
HLCL041	へリオス	肝臓原基 (iPS 細胞由来)	尿素サイクル異常症	非臨床	<a href="https://www.healios.co.jp/development/ipsc/">https://www.healios.co.jp/development/ipsc/</a>
—	メガカリオン	血小板 (iPS 細胞由来)	輸血	非臨床	<a href="http://www.megakaryon.com/project/">http://www.megakaryon.com/project/</a>
—	大日本住友製薬	網膜細胞 (iPS 細胞由来)	網膜色素変性症	非臨床	大日本住友製薬統合報告書 2020
—	大日本住友製薬	ネフロン前駆細胞 (iPS 細胞由来)	腎不全	非臨床	大日本住友製薬統合報告書 2020
iPS-NKT	ブライトパス・バイオ	NKT 細胞 (iPS 細胞由来)	頭頸部がん	非臨床	<a href="https://www.brightpathbio.com/pipeline/index.html">https://www.brightpathbio.com/pipeline/index.html</a>

## 第5章 結語

本研究では、G-CSF が JAK/STAT3 シグナルを介して多能性幹細胞からの心筋分化を促進することに着目し、これを経済的かつ安定供給可能な条件下で再現することを目指して、人工 G-CSF キメラ受容体の開発を行った。

代替リガンド BSA-FL に応答する scFv を細胞外領域にもつ人工 G-CSF キメラ受容体を構築し、マウス iPS 細胞に導入し解析を行った結果、リガンド依存的に JAK/STAT3 シグナルを惹起した。また、心筋マーカーの発現上昇と、カルシウムオシレーションを伴う自己拍動を示す心筋細胞への分化効率を促進した研究結果から、目的とする人工キメラ受容体コンセプトが実証された (Tsukamoto et al., 2020)。

以上の研究成果は、人工キメラ受容体を多能性幹細胞からの分化誘導に応用した、科学的に新規性の高いものであるだけでなく、多能性幹細胞の再生医療応用における課題に対し、多角的に貢献可能な技術基盤の開発に寄与するものであると期待される。

## 謝辞

立命館大学生命科学部生命医科学科 川村晃久教授には、博士課程後期課程における指導教官として、また、本博士論文における主査として、多岐に渡りご指導、ご鞭撻を賜りました。ここに深く感謝申し上げます。また、立命館大学生命科学部生命情報学科 天野晃教授、立命館大学生命科学部生命医科学科 白壁恭子教授には本論文の副査としてご指導いただきましたこと、感謝申し上げます。

また、本論文の研究を実施するにあたり、医薬基盤・健康・栄養研究所 河原正浩先生、一般財団法人総合研究奨励会 長棟輝行先生には、人工キメラ受容体の構築に関わる実験材料の提供から実験手法に関するご助言を賜りましたこと、感謝申し上げます。本研究の遂行に際して多大なご協力・ご助言をいただいた立命館大学生命科学部生命医科学科 中尾周助教、立命館グローバル・イノベーション機構 十河孝浩研究員、ならびに日々の研究の実施におきまして、ご助力頂いた立命館大学生命科学部生命医科学科幹細胞・再生医学研究室の皆様にご感謝申し上げます。入学の機会を与えて頂き、社会人と学生との両立を支えて頂いた上司であり先輩である奥田智彦氏に深く感謝申し上げます。最後に、あたたかい励ましを送り続けてくれた家族と友人に心から感謝します。

## 参考文献

Adachi, Y., Imagawa, J., Suzuki, Y., Yogo, K., Fukazawa, M., Kuromaru, O., and Saito, Y. (2004). G-CSF treatment increases side population cell infiltration after myocardial infarction in mice. *J Mol Cell Cardiol* *36*, 707-710.

Altara, R., Harmancey, R., Didion, S.P., Booz, G.W., and Zouein, F.A. (2016). Cardiac STAT3 deficiency impairs contractility and metabolic homeostasis in hypertension. *Front Pharmacol* *7*, 436.

Balsam, L.B., Wagers, A.J., Christensen, J.L., Kofidis, T., Weissman, I.L., and Robbins, R.C. (2004). Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* *428*, 668-673.

Becker, A.J., Mc, C.E., and Till, J.E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* *197*, 452-454.

Bers, D.M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* *415*, 198-205.

Boengler, K., Ungefug, E., Heusch, G., and Schulz, R. (2013). The STAT3 inhibitor stattic impairs cardiomyocyte mitochondrial function through increased reactive oxygen species formation. *Curr Pharm Des* *19*, 6890-6895.

Bourillot, P.Y., Aksoy, I., Schreiber, V., Wianny, F., Schulz, H., Hummel, O., Hubner, N., and Savatier, P. (2009). Novel STAT3 target genes exert distinct roles in the inhibition of mesoderm and endoderm differentiation in cooperation with Nanog. *Stem Cells* *27*, 1760-1771.

BurrIDGE, P.W., Matsa, E., Shukla, P., Lin, Z.C., Churko, J.M., Ebert, A.D., Lan, F., Diecke, S., Huber, B., Mordwinkin, N.M., *et al.* (2014). Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods* *11*, 855-860.

Cai, B., Li, J., Wang, J., Luo, X., Ai, J., Liu, Y., Wang, N., Liang, H., Zhang, M., Chen, N., *et al.* (2012). microRNA-124 regulates cardiomyocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells via targeting STAT3 signaling. *Stem Cells* *30*, 1746-1755.

Chen, C., Huang, X., Atakilit, A., Zhu, Q.S., Corey, S.J., and Sheppard, D. (2006). The Integrin  $\alpha 9\beta 1$  contributes to granulopoiesis by enhancing granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling. *Immunity* 25, 895-906.

Chen, H., Aksoy, I., Gonnot, F., Osteil, P., Aubry, M., Hamela, C., Rognard, C., Hochard, A., Voisin, S., Fontaine, E., *et al.* (2015). Reinforcement of STAT3 activity reprogrammes human embryonic stem cells to naive-like pluripotency. *Nat Commun* 6, 7095.

Chen, L., Zhao, L., Samanta, A., Mahmoudi, S.M., Buehler, T., Cantilena, A., Vincent, R.J., Girgis, M., Breeden, J., Asante, S., *et al.* (2017). STAT3 balances myocyte hypertrophy vis-a-vis autophagy in response to Angiotensin II by modulating the AMPK $\alpha$ /mTOR axis. *PLoS One* 12, e0179835.

Chen, X., Xu, H., Yuan, P., Fang, F., Huss, M., Vega, V.B., Wong, E., Orlov, Y.L., Zhang, W., Jiang, J., *et al.* (2008). Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* 133, 1106-1117.

Cowan, C.A., Klimanskaya, I., McMahon, J., Atienza, J., Witmyer, J., Zucker, J.P., Wang, S., Morton, C.C., McMahon, A.P., Powers, D., *et al.* (2004). Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med* 350, 1353-1356.

Datta, R., Bansal, T., Rana, S., Datta, K., Datta Chaudhuri, R., Chawla-Sarkar, M., and Sarkar, S. (2017). Myocyte-derived Hsp90 modulates collagen upregulation via biphasic activation of STAT-3 in fibroblasts during cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biol* 37.

de Wildt, R.M., Tomlinson, I.M., van Venrooij, W.J., Winter, G., and Hoet, R.M. (2000). Comparable heavy and light chain pairings in normal and systemic lupus erythematosus IgG(+) B cells. *Eur J Immunol* 30, 254-261.

Demetri, G.D., and Griffin, J.D. (1991). Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 78, 2791-2808.

Enomoto, D., Obana, M., Miyawaki, A., Maeda, M., Nakayama, H., and Fujio, Y. (2015). Cardiac-specific ablation of the STAT3 gene in the subacute phase of myocardial infarction exacerbated cardiac remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 309, H471-480.

Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.

- Fang, Y., Gupta, V., Karra, R., Holdway, J.E., Kikuchi, K., and Poss, K.D. (2013). Translational profiling of cardiomyocytes identifies an early Jak1/Stat3 injury response required for zebrafish heart regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 13416-13421.
- Feigal, E.G., DeWitt, N.D., Cantilena, C., Peck, C., and Stroncek, D. (2019). At the end of the beginning: immunotherapies as living drugs. *Nat Immunol* *20*, 955-962.
- Fukunaga, R., Ishizaka-Ikeda, E., Pan, C.X., Seto, Y., and Nagata, S. (1991). Functional domains of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *EMBO J* *10*, 2855-2865.
- Haghikia, A., Missol-Kolka, E., Tsikas, D., Venturini, L., Brundiers, S., Castoldi, M., Muckenthaler, M.U., Eder, M., Stapel, B., Thum, T., *et al.* (2011). Signal transducer and activator of transcription 3-mediated regulation of miR-199a-5p links cardiomyocyte and endothelial cell function in the heart: a key role for ubiquitin-conjugating enzymes. *Eur Heart J* *32*, 1287-1297.
- Harada, M., Qin, Y., Takano, H., Minamino, T., Zou, Y., Toko, H., Ohtsuka, M., Matsuura, K., Sano, M., Nishi, J., *et al.* (2005). G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med* *11*, 305-311.
- Hilfiker-Kleiner, D., Hilfiker, A., Fuchs, M., Kaminski, K., Schaefer, A., Schieffer, B., Hillmer, A., Schmiedl, A., Ding, Z., Podewski, E., *et al.* (2004). Signal transducer and activator of transcription 3 is required for myocardial capillary growth, control of interstitial matrix deposition, and heart protection from ischemic injury. *Circ Res* *95*, 187-195.
- Hirota, H., Chen, J., Betz, U.A.K., Rajewsky, K., Gu, Y., Ross, J., Müller, W., and Chien, K.R. (1999). Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell* *97*, 189-198.
- Jackson, K.A., Majka, S.M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C.J., Majesky, M.W., Entman, M.L., Michael, L.H., Hirschi, K.K., and Goodell, M.A. (2001). Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* *107*, 1395-1402.
- Jopling, C., Sleep, E., Raya, M., Marti, M., Raya, A., and Izpisua Belmonte, J.C. (2010). Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature* *464*, 606-609.

Jossen, V., van den Bos, C., Eibl, R., and Eibl, D. (2018). Manufacturing human mesenchymal stem cells at clinical scale: process and regulatory challenges. *Appl Microbiol Biotechnol* *102*, 3981-3994.

Kawada, H., Fujita, J., Kinjo, K., Matsuzaki, Y., Tsuma, M., Miyatake, H., Muguruma, Y., Tsuboi, K., Itabashi, Y., Ikeda, Y., *et al.* (2004). Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* *104*, 3581-3587.

Kawahara, M., Chen, J., Sogo, T., Teng, J., Otsu, M., Onodera, M., Nakauchi, H., Ueda, H., and Nagamune, T. (2011). Growth promotion of genetically modified hematopoietic progenitors using an antibody/c-Mpl chimera. *Cytokine* *55*, 402-408.

Kawahara, M., Hitomi, A., and Nagamune, T. (2014). S-Fms signalobody enhances myeloid cell growth and migration. *Biotechnol J* *9*, 954-961.

Kawahara, M., Kimura, H., Ueda, H., and Nagamune, T. (2004). Selection of genetically modified cell population using hapten-specific antibody/receptor chimera. *Biochem Biophys Res Commun* *315*, 132-138.

Kawahara, M., Shimo, Y., Sogo, T., Hitomi, A., Ueda, H., and Nagamune, T. (2008). Antigen-mediated migration of murine pro-B Ba/F3 cells via an antibody/receptor chimera. *J Biotechnol* *133*, 154-161.

Kawahara, M., Ueda, H., Morita, S., Tsumoto, K., Kumagai, I., and Nagamune, T. (2003). Bypassing antibiotic selection: positive screening of genetically modified cells with an antigen-dependent proliferation switch. *Nucleic Acids Res* *31*, e32.

Kawahara, M., Ueda, H., Tsumoto, K., Kumagai, I., Mahoney, W., and Nagamune, T. (2001). A growth signal with an artificially induced erythropoietin receptor-gp130 cytoplasmic domain heterodimer. *J Biochem* *130*, 305-312.

Kawamura, T., Suzuki, J., Wang, Y.V., Menendez, S., Morera, L.B., Raya, A., Wahl, G.M., and Izpisua Belmonte, J.C. (2009). Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* *460*, 1140-1144.

Kempf, H., and Zweigerdt, R. (2018). Scalable cardiac differentiation of pluripotent stem cells using specific growth factors and small molecules. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 163, 39-69.

Kocher, A.A., Schuster, M.D., Szabolcs, M.J., Takuma, S., Burkhoff, D., Wang, J., Homma, S., Edwards, N.M., and Itescu, S. (2001). Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 7, 430-436.

Kondo, Y., Toyoda, T., Inagaki, N., and Osafune, K. (2018). iPSC technology-based regenerative therapy for diabetes. *J Diabetes Investig* 9, 234-243.

Liang, J., Wang, D., Renaud, G., Wolfsberg, T.G., Wilson, A.F., and Burgess, S.M. (2012). The *stat3/socs3a* pathway is a key regulator of hair cell regeneration in zebrafish. [corrected]. *J Neurosci* 32, 10662-10673.

Liu, W., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T. (2009). The influence of domain structures on the signal transduction of chimeric receptors derived from the erythropoietin receptor. *J Biochem* 145, 575-584.

Mai, T., Markov, G.J., Brady, J.J., Palla, A., Zeng, H., Sebastiano, V., and Blau, H.M. (2018). NKX3-1 is required for induced pluripotent stem cell reprogramming and can replace OCT4 in mouse and human iPSC induction. *Nat Cell Biol* 20, 900-908.

Manabe, Y., Miyatake, S., Takagi, M., Nakamura, M., Okeda, A., Nakano, T., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., and Fujii, N.L. (2012). Characterization of an acute muscle contraction model using cultured C2C12 myotubes. *PLoS One* 7, e52592.

Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7634-7638.

Matsuda, T., Nakamura, T., Nakao, K., Arai, T., Katsuki, M., Heike, T., and Yokota, T. (1999). STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J* 18, 4261-4269.

Melendez, G.C., McLarty, J.L., Levick, S.P., Du, Y., Janicki, J.S., and Brower, G.L. (2010). Interleukin 6 mediates myocardial fibrosis, concentric hypertrophy, and diastolic dysfunction in rats. *Hypertension* 56, 225-231.



Minatoguchi, S., Takemura, G., Chen, X.H., Wang, N., Uno, Y., Koda, M., Arai, M., Misao, Y., Lu, C., Suzuki, K., *et al.* (2004). Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. *Circulation* *109*, 2572-2580.

Murry, C.E., Soonpaa, M.H., Reinecke, H., Nakajima, H., Nakajima, H.O., Rubart, M., Pasumarthi, K.B., Virag, J.I., Bartelmez, S.H., Poppa, V., *et al.* (2004). Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* *428*, 664-668.

Negoro, S., Kunisada, K., Fujio, Y., Funamoto, M., Darville, M.I., Eizirik, D.L., Osugi, T., Izumi, M., Oshima, Y., Nakaoka, Y., *et al.* (2001). Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase. *Circulation* *104*, 979-981.

Negoro, S., Kunisada, K., Tone, E., Funamoto, M., Oh, H., Kishimoto, T., and Yamauchi-Takahara, K. (2000). Activation of JAK/STAT pathway transduces cytoprotective signal in rat acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res* *47*, 797-805.

Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., and Smith, A. (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* *12*, 2048-2060.

Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D., and Adachi, K. (2009). A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* *460*, 118-122.

Norol, F., Merlet, P., Isnard, R., Sebillon, P., Bonnet, N., Cailliot, C., Carrion, C., Ribeiro, M., Charlotte, F., Pradeau, P., *et al.* (2003). Influence of mobilized stem cells on myocardial infarct repair in a nonhuman primate model. *Blood* *102*, 4361-4368.

O'Meara, C.C., Wamstad, J.A., Gladstone, R.A., Fomovsky, G.M., Butty, V.L., Shrikumar, A., Gannon, J.B., Boyer, L.A., and Lee, R.T. (2015). Transcriptional reversion of cardiac myocyte fate during mammalian cardiac regeneration. *Circ Res* *116*, 804-815.

O'Sullivan, K.E., Breen, E.P., Gallagher, H.C., Buggy, D.J., and Hurley, J.P. (2016). Understanding STAT3 signaling in cardiac ischemia. *Basic Res Cardiol* *111*, 27.

Obana, M., Maeda, M., Takeda, K., Hayama, A., Mohri, T., Yamashita, T., Nakaoka, Y., Komuro, I., Takeda, K., Matsumiya, G., *et al.* (2010). Therapeutic activation of signal transducer and activator of transcription 3 by interleukin-11 ameliorates cardiac fibrosis after myocardial infarction. *Circulation* 121, 684-691.

Okano, H., and Yamanaka, S. (2014). iPS cell technologies: significance and applications to CNS regeneration and disease. *Mol Brain* 7, 22.

Okura, Y., Ramadan, M.M., Ohno, Y., Mitsuma, W., Tanaka, K., Ito, M., Suzuki, K., Tanabe, N., Kodama, M., and Aizawa, Y. (2008). Impending epidemic: future projection of heart failure in Japan to the year 2055. *Circ J* 72, 489-491.

Onizuka, T., Yuasa, S., Kusumoto, D., Shimoji, K., Egashira, T., Ohno, Y., Kageyama, T., Tanaka, T., Hattori, F., Fujita, J., *et al.* (2012). Wnt2 accelerates cardiac myocyte differentiation from ES-cell derived mesodermal cells via non-canonical pathway. *J Mol Cell Cardiol* 52, 650-659.

Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S.M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D.M., *et al.* (2001a). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410, 701-705.

Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Limana, F., Jakoniuk, I., Quaini, F., Nadal-Ginard, B., Bodine, D.M., Leri, A., and Anversa, P. (2001b). Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10344-10349.

Oshima, Y., Fujio, Y., Nakanishi, T., Itoh, N., Yamamoto, Y., Negoro, S., Tanaka, K., Kishimoto, T., Kawase, I., and Azuma, J. (2005). STAT3 mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury through metallothionein induction in the heart. *Cardiovasc Res* 65, 428-435.

Panopoulos, A.D., Yanes, O., Ruiz, S., Kida, Y.S., Diep, D., Tautenhahn, R., Herrerias, A., Batchelder, E.M., Plongthongkum, N., Lutz, M., *et al.* (2012). The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming. *Cell Res* 22, 168-177.

Rong, J., Li, L., Jing, L., Fang, H., and Peng, S. (2016). JAK2/STAT3 pathway mediates protection of metallothionein against doxorubicin-induced cytotoxicity in mouse cardiomyocytes. *Int J Toxicol* 35, 317-326.

Shi, Y., Inoue, H., Wu, J.C., and Yamanaka, S. (2017). Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov* 16, 115-130.

Shimoji, K., Yuasa, S., Onizuka, T., Hattori, F., Tanaka, T., Hara, M., Ohno, Y., Chen, H., Egasgira, T., Seki, T., *et al.* (2010). G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes in vivo and in derivation from ESCs and iPSCs. *Cell Stem Cell* 6, 227-237.

Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M., and Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336, 688-690.

Sogo, T., Kawahara, M., Tsumoto, K., Kumagai, I., Ueda, H., and Nagamune, T. (2008). Selective expansion of genetically modified T cells using an antibody/interleukin-2 receptor chimera. *J Immunol Methods* 337, 16-23.

Sogo, T., Kawahara, M., Ueda, H., Otsu, M., Onodera, M., Nakauchi, H., and Nagamune, T. (2009). T cell growth control using hapten-specific antibody/interleukin-2 receptor chimera. *Cytokine* 46, 127-136.

Srivastava, D. (2006). Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis. *Cell* 126, 1037-1048.

Suemori, H., Yasuchika, K., Hasegawa, K., Fujioka, T., Tsuneyoshi, N., and Nakatsuji, N. (2006). Efficient establishment of human embryonic stem cell lines and long-term maintenance with stable karyotype by enzymatic bulk passage. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 926-932.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.

Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1997). Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3801-3804.

Tamada, T., Honjo, E., Maeda, Y., Okamoto, T., Ishibashi, M., Tokunaga, M., and Kuroki, R. (2006). Homodimeric cross-over structure of the human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor signaling complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 3135-3140.

Tanaka, K., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T. (2009). Selection and growth regulation of genetically modified cells with hapten-specific antibody/receptor tyrosine kinase chimera. *Biotechnol Prog* *25*, 1138-1145.

Tang, Y., Luo, Y., Jiang, Z., Ma, Y., Lin, C.J., Kim, C., Carter, M.G., Amano, T., Park, J., Kish, S., *et al.* (2012). Jak/Stat3 signaling promotes somatic cell reprogramming by epigenetic regulation. *Stem Cells* *30*, 2645-2656.

Thompson, J.E., Cubbon, R.M., Cummings, R.T., Wicker, L.S., Frankshun, R., Cunningham, B.R., Cameron, P.M., Meinke, P.T., Liverton, N., Weng, Y., *et al.* (2002). Photochemical preparation of a pyridone containing tetracycline: a Jak protein kinase inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett* *12*, 1219-1223.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* *282*, 1145-1147.

Tsai, C.T., Lai, L.P., Kuo, K.T., Hwang, J.J., Hsieh, C.S., Hsu, K.L., Tseng, C.D., Tseng, Y.Z., Chiang, F.T., and Lin, J.L. (2008). Angiotensin II activates signal transducer and activators of transcription 3 via Rac1 in atrial myocytes and fibroblasts: implication for the therapeutic effect of statin in atrial structural remodeling. *Circulation* *117*, 344-355.

Tsukamoto, T., Sogo, T., Ueyama, T., Nakao, S., Harada, Y., Ihara, D., Akagi, Y., Kida, Y.S., Hasegawa, K., Nagamune, T., *et al.* (2020). Chimeric G-CSF receptor-Mediated STAT3 activation contributes to efficient induction of cardiomyocytes from mouse induced pluripotent stem cells. *Biotechnol J* *15*, e1900052.

Uccelli, A., Moretta, L., and Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* *8*, 726-736.

Ueda, T., and Kaneko, S. (2020). Induced pluripotent stem cell-derived natural killer cells gene-modified to express chimeric antigen receptor-targeting solid tumors. *Int J Hematol* *111*, 247-255.

Uozumi, H., Hiroi, Y., Zou, Y., Takimoto, E., Toko, H., Niu, P., Shimoyama, M., Yazaki, Y., Nagai, R., and Komuro, I. (2001). gp130 plays a critical role in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 276, 23115-23119.

van Oosten, A.L., Costa, Y., Smith, A., and Silva, J.C. (2012). JAK/STAT3 signalling is sufficient and dominant over antagonistic cues for the establishment of naive pluripotency. *Nat Commun* 3, 817.

Waseda, M., and Kaneko, S. (2020). Podoplanin as an attractive target of CAR T cell therapy. *Cells* 9, 1971.

Welte, K., Gabilove, J., Bronchud, M.H., Platzer, E., and Morstyn, G. (1996). Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years. *Blood* 88, 1907-1929.

Wu, J., Guo, W., Lin, S.Z., Wang, Z.J., Kan, J.T., Chen, S.Y., and Zhu, Y.Z. (2016). Gp130-mediated STAT3 activation by S-propargyl-cysteine, an endogenous hydrogen sulfide initiator, prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cell Death Dis* 7, e2339.

Yamauchi-Takahara, K., and Kishimoto, T. (2000). A novel role for STAT3 in cardiac remodeling. *Trends Cardiovasc Med* 10, 298-303.

Yang, J., van Oosten, A.L., Theunissen, T.W., Guo, G., Silva, J.C., and Smith, A. (2010). Stat3 activation is limiting for reprogramming to ground state pluripotency. *Cell Stem Cell* 7, 319-328.

Yasukawa, H., Hoshijima, M., Gu, Y., Nakamura, T., Pradervand, S., Hanada, T., Hanakawa, Y., Yoshimura, A., Ross, J., Jr., and Chien, K.R. (2001). Suppressor of cytokine signaling-3 is a biomechanical stress-inducible gene that suppresses gp130-mediated cardiac myocyte hypertrophy and survival pathways. *J Clin Invest* 108, 1459-1467.

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., *et al.* (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.

Yuasa, S., Itabashi, Y., Koshimizu, U., Tanaka, T., Sugimura, K., Kinoshita, M., Hattori, F., Fukami, S., Shimazaki, T., Ogawa, S., *et al.* (2005). Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23, 607-611.

Zhao, X.F., Wan, J., Powell, C., Ramachandran, R., Myers, M.G., Jr., and Goldman, D. (2014). Leptin and IL-6 family cytokines synergize to stimulate Muller glia reprogramming and retina regeneration. *Cell Rep* 9, 272-284.