

博士論文要旨

論文題名：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

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

ツカモト タスク

塚本 輔

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主要な死因となる重症心疾患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 3 (STAT3) 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キメラ G-CSF 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 に蛍光分子 fluorescein をコンジュゲートさせた代替リガンドを用いて、人工キメラ G-CSF 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に繋がる成果であると考えられる。

Abstract of Doctoral Thesis

Title: Application of artificial chimeric receptors to regulate STAT3 signaling for myocardial differentiation from induced pluripotent stem cells

Doctoral Program in Advanced Life Sciences

Graduate School of Life Sciences

Ritsumeikan University

ツカモト タスク

TSUKAMOTO Tasuku

Facing the super-aging society, extension of healthy life expectancy is a societal issue. Despite the great progress in the medical field, there has been a great demand for development of tissue engineering and regenerative therapy, such as myocardial cell transplantation for the treatment of severe heart disease. Induced pluripotent stem (iPS) cells can be generated from patient's cells and possess the capacity of self-renewal and multilineage differentiation, and thus are expected to be a useful source for regeneration therapy. Although numerous studies have been reported so far regarding the iPS cell-based regenerative medicine, there remain many unsolved issues including effective production of functional cells and cost-effective manufacturing.

To solve these issues, it is necessary to clarify and regulate the molecular mechanisms underlying differentiation of iPS cells. Janus kinase (JAK) signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling are well known pathways, which play a critical role in the acquisition, maintenance, and differentiation of iPS cells. While JAK/STAT3 signaling is activated by several types of cytokines, we focused Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) and its receptor, GCSFR. Because it was reported that G-CSF-mediated activation of JAK/STAT3 signaling enhances cardiomyocyte differentiation from iPS cells, economical and effective regulation G-CSF/GCSFR axis could be a clue to overcome the issues mentioned above.

In this study, we developed chimeric GCSFR containing anti-surrogate-ligand single-chain variable fragment (scFv) in the extracellular region. Stimulation of chimeric GCSFR by BSA-FL (Fluorescein-conjugated bovine serum albumin), as a surrogate ligand, activated endogenous JAK/STAT3 signaling and enhanced the incidence of self-beating cell clusters. In addition, BSA-FL stimulation promoted differentiation of cardiomyocytes exhibiting cardiac-specific marker expressions and oscillation of the intracellular calcium ion level.

These findings suggest that chimeric GCSFR-mediated approach may contribute to cost-effectiveness of cardiac regeneration therapy.