

ヒト歯肉線維芽細胞との共培養が iPS 細胞の心筋細胞への成熟に与える影響

松田祐典

緒言

世界保健機構 (World Health Organization : WHO) の発表した 2015 年の世界全体の死亡原因のトップは虚血性心疾患であり、その後に生じる心不全は罹患率・死亡率が高く、深刻な医学的問題である¹⁾。心不全に対して内科的・外科的治療は日々進歩しているが、心臓は自己再生能が乏しいため現状の治療方法では回復が困難であり、その最終的な治療方法は心臓移植のみである。本邦では 2010 年の改正臓器移植法施行後、脳死臓器提供が増加したことに伴い心臓移植の実施数も増加し、2015 年の心臓移植の件数は 44 件であった。これに対して心臓移植登録者数は 2016 年末において 493 人となり、著しいドナー心臓の不足が問題となっている^{2,3)}。

そこで iPS (induced Pluripotent Stem) 細胞を用いた再生医療が、代替医療として注目されている⁴⁾。1998 年より ES (Embryonic Stem) 細胞が如何なる細胞への分化能をも有する多能性幹細胞として様々な組織の再生が期待され、心筋細胞の分野においても研究がなされてきたが、倫理的問題が指摘されていた。しかしその後 2007 年より ES 細胞のもつ倫理的問題を解決した iPS 細胞が樹立され、これまで ES 細胞で培われた技術を応用することで盛んに研究がなされている。

iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導は将来的に臨床応用が期待され、様々な方法が考案されてきた。しかし、腫瘍形成のリスクがあること、心筋細胞への分化誘導効率が低いこと、また異種動物由来材料の混入による安全性のリスクが課題と指摘されている⁴⁾。iPS 細胞の培養において外因性フィーダー細胞は、幹細胞の多能性を維持するために広く使用されており⁵⁾、一般的にマウス胚線維芽細胞 (Mouse Embryonic Fibroblast: MEF) がフィーダー細胞として使用され、フィーダー細胞を用いないフィーダーレス培養の場合は Matrigel® (Corning, NY, USA) 等が使用されており、これらはいずれもマウス由来材料である。一方でヒト包皮線維芽細胞やラミニン 511-E8 断片 (iMatrix-511®, Nippi, CA, USA) 等のヒト由来材料も使用されているが、前者は採取に伴う侵襲が大きく、後者は分化誘導された心筋細胞の収縮力が弱いことなどの問題点がある。先行研究において心筋細胞と非心筋細胞間のクロストークが興奮収縮連関において重要であることが示されており^{6,7)}、特に共培養された心筋線維芽細胞は心筋細胞の増殖を促進することを示している⁸⁾。これは線維芽細胞が iPS 細胞の分化誘導を促進し、心筋細胞の成熟に影響を及ぼす因子であることを示唆している。以上より、ヒト由来の線維芽細胞を簡易な方法で採取し、フィーダー細胞として iPS 細胞と共培養し収縮力の強い心筋細胞を分化誘導し作製された iPS 細胞由来心筋細胞 (iPS-CM) を、収縮力の低下した心臓に自家移植を行うことで、安全性の問題は解決されると考えた。そこで、採取の際に容易にアクセス可能であり、口腔粘膜の創傷治癒能力が皮膚よりも優れていることから、ヒト歯肉線維芽細胞 (Human Gingival

Fibroblast : HGF) をフィーダー細胞として使用することとした。HGF が iPS 細胞の培養における従来の異種動物由来のフィーダー細胞およびコーティング剤の代替物として使用可能であることが実証されれば、自家移植を目的とした心筋組織形成の過程において、異種動物由来材料の混入による安全性のリスクが解消される。

本研究では、HGF をフィーダー細胞として iPS 細胞と共培養し、心筋細胞へ分化誘導した。さらに分化誘導された組織に免疫染色、qPCR を行い、心筋細胞への成熟を評価した。また、拍動する iPS-CM を撮影した動画を解析し、収縮能を定量化・評価した。

材料ならびに方法

HGF の単離

岡山大学病院矯正歯科治療中の患者の抜歯を行う際に、約 2 mm³ の歯肉組織を採取した。患者は 16 歳以上とし、歯周炎を有する患者は除外した。採取された歯肉組織片を 4 µg/ml ゲンタマイシン (Thermo Fisher Scientific、MA、USA) および 50 µg/ml アンホテリシン B (Sigma Aldrich、MO、USA) を添加したリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) で 4 回洗浄した。続いて、組織培養皿に入れて細かく刻み、10 %ウシ胎仔血清 (FBS : Sigma Aldrich、MO、USA)、1 mol / l-HEPES 緩衝溶液 (ナカライテスク、京都、日本) およびペニシリン - ストレプトマイシン溶液 (和光純薬、大阪、日本) を添加したダルベッコ・モディファイド・イーグル低グルコース培地 (Thermo Fisher

Scientific, MA, USA) を加え 37 °C、5 %CO₂加湿インキュベーター中で静置培養した。組織培養皿内でコンフルエントになった HGF に定期的にトリプシン処理を行い継代した。すべての実験は第 3 から第 22 継代間の HGF を用いて行った。

なお本研究の HGF の取り扱いおよび実験手順はすべて、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会の承認（承認番号 1612-007-002）のもとに行い、研究に参加する前に、すべての被験者からインフォームドコンセントを得た。

iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞 (201B7 型) を理化学研究所 (茨城、日本) から購入し、培地は StemFit AK02N 培地 (味の素、東京、日本) を使用した。まず、PBS で 0.5 µg/ml に希釈したラミニン 511-E8 断片を 6 ウェル培養プレートに 2 ml/ウェル添加し 37 °C、5 %CO₂ 加湿インキュベーター中に静置しコーティングした。1 時間後、ラミニン 511-E8 断片溶液を除去し、iPS 細胞を培地の製造者によって提供されたプロトコルに従って播種した。要約すると以下の通りである。iPS 細胞の培養皿から使用済み培地を除去し、細胞を PBS で洗浄した。続いて、800 µl の TrypLE Select (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を添加し、37 °C、5 %CO₂ の加湿インキュベーター内で 7 分間インキュベートした。次いで、TrypLE Select を除去し、細胞を再び PBS で洗浄し、Rho 結合キナーゼ阻害剤である Y-27632 (10 µM) を含む 1 ml の StemFit AK02N 培地を添加した。次いで、培養皿の底面に接着している iPS 細胞をスクレーパーを用いて剥がし、15 ml の遠心管に集め、ラミニン 511-E8 断片でコーティングした 6 ウェル培養プレート上に 1.3×10^5 cells/ウェルの密度で播種した。翌日、培地を除去し Y-

27632 を含まない StemFit AK02N 培地と交換した。培地は 1 日目、2 日目、5 日目および 6 日目に交換した。すべての実験は、第 7 から第 20 継代間の iPS 細胞を用いて行った。

iPS 細胞の心筋細胞への分化誘導

心筋細胞への分化プロトコルは、96 ウェル培養プレートを用いて行い、HGF は iPS 細胞のフィーダー細胞として使用した。HGF は 1.5×10^4 cells/ウェルの密度で播種した。フィーダーレス培養の条件を作製するために、ラミニン 511-E8 断片を PBS で $2.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈し、各ウェルに 0.2 ml のラミニン 511-E8 断片溶液を添加し、 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 5 \%CO_2 の加湿インキュベーター内で 1 時間コーティングした。続いて、iPS 細胞をオンフィーダー培養およびフィーダーレス培養の 96 ウェル培養プレート上に 2.0×10^5 cells /ウェルの密度で播種した。播種の 1 日後、Essential 8 培地 (Thermo Fisher Scientific、MA、USA) で 3 日間培養し、培地を毎日交換した。続いて、iPS 細胞の分化誘導を、PSC cardiomyocyte Differentiation Kits (Thermo Fisher Scientific、MA、USA) を用い製造者のプロトコルに従って開始した。要約すると以下の通りである。培地を除去し、心筋細胞分化培地 A を添加した。2 日後、培地を除去し、心筋細胞分化培地 B を添加した。2 日間インキュベートした後、培地を除去し、心筋細胞維持用培地を添加した。その後 1 日おきに心筋細胞維持培地を交換した。そして、5、15 および 30 日目に免疫染色および qPCR を用いて、iPS 細胞の心筋細胞へ

の分化を評価した。30 日目に iPS-CM の収縮能を、動画を撮影・解析し定量化した。

免疫染色

多能性マーカーおよび心筋マーカーの発現レベルを、免疫染色により評価した。免疫染色の前に、細胞を室温で 15 分間、PBS 中の 4 %パラホルムアルデヒドで固定し、続いて PBS で 3 回洗浄した。次いで、細胞を 0.2 %Triton X-100 (ナカライテスク、京都、日本) で 15 分間透過処理し、3 %ウシ血清アルブミン (BSA : Sigma Aldrich、MO、USA) で 30 分間ブロッキングした。続いて、一次抗体を添加し 4 °Cで一晩インキュベートした。次いで、PBS で 3 回洗浄した後、二次抗体を添加し室温で 1 時間インキュベートした。NucBlue®試薬 (Thermo Fisher Scientific、MA、USA) を添加した PBS で 5 分間インキュベートし、続いて PBS で 3 回洗浄することにより、核を染色した。一次抗心筋トロポニン T マウスモノクローナル抗体 (13-11) (cTnT : Thermo Scientific、Rockford、IL、USA) は 3 %BSA で 1/750 の希釈を行い、一次抗 Nkx2.5 ラビットモノクローナル抗体 (4H5L9) (Thermo Scientific、Rockford、IL、USA) は 3 %BSA で 1/750 の希釈で適用した。二次抗体はヤギ抗マウス抗体 Alexa Fluor 488 (Life Technologies、UK) およびロバ抗ラビット抗体 Alexa Fluor 555 (Life Technologies、UK) を 3 %BSA でそれぞれ 1/1000 および 1/250 に希釈した。Fluorescence Microscope (対物レンズ : 4 倍、BZ-X710、KEYENCE、大阪、日本) および共焦点顕微鏡 (対物レンズ : 20 倍、FLUOVIEW FV1000、OLYMPUS、東京、日本) を用

いて蛍光画像を取得した。全ての画像は同一の条件で撮影した。

qPCR

High Pure RNA Isolation Kit (Roche, IN, USA) を用いて RNA を抽出し、Verso cDNA 合成キット (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて cDNA に逆転写した。SYBR Green 試薬 (Life Technologies, Warrington, UK) および心筋マーカである cTnT、中胚葉マーカである Nkx2.5、多能性マーカである Sox2、Oct4 の mRNA と 18S の rRNA のプライマーを用いリアルタイム PCR を使用して、標的遺伝子の発現レベルを定量した。プライマーの塩基配列を表 1 に示す。標的遺伝子の発現量を 18S rRNA の発現量で正規化し、 $\Delta \Delta Ct$ 法により算出した。すべての測定は、標的遺伝子ごとにトリPLICATEで 3 つの独立したサンプルで実施した。

iPS-CM の動画解析

iPS-CM の収縮の位相差顕微鏡動画を、顕微鏡 (BZ-X710、KEYENCE、大阪、日本) を用いて分化誘導 30 日目に室温で 10 秒間記録した。全ての動画は、各ウェルの中心に固定された位置で、4 倍の対物レンズを用いて 20 フレーム/秒で撮影した。この動画のフレーム 1 とそれに続くすべてのフレーム (フレーム 1 とフレーム 2、フレーム 1 とフレーム 3、フレーム 1 とフレーム 4 等) との間で、変位ベクトル場を計算した。変位ベクトル場の計算にはフィジソフトの粒子画像速度測定プラグイン⁹⁾ (image J、

国立衛生研究所¹⁰⁾を用い、16×16ピクセルごとに変位ベクトル $D(x,y)$ を求めた。最大変位のベクトル $M(x,y)$ は、 (x,y) 対ごとに以下のように定義した。

$$M(x,y) = D_k(x,y)$$

ここで、 k は $|D_k(x,y)| = \max [|D_2(x,y)|, |D_3(x,y)|, \dots, |D_n(x,y)|]$ となるフレーム番号、 n は最後のフレーム番号（本研究では $n = 200$ ）を示す。最後に、収縮能 C を以下のように任意単位で計算した。

$$C = \sum_{x,y} |M(x,y)|.$$

統計解析

収縮能データは、平均±標準誤差（SEM）として表した。2群間の比較はスチューデントの t 検定で行った。差は、 $p < 0.05$ の場合に有意であるとみなした。

結果

心筋マーカータンパク質の発現

iPS 細胞の心筋分化を確認するために、最も用いられている中胚葉マーカーの Nkx2.5¹¹⁾ および心筋マーカーの cTnT の免疫染色を行った。図 2a に示すように、iPS-CM はオンフィーダー培養とフィーダーレス培養の両方の条件において cTnT の発現が 5 日目から徐々に検出され、30 日目に著しく増加していた。30 日目の共焦点顕微鏡像では Nkx2.5 の発現も検出された（図 2Ba、b、c）。形態に関しては、オンフィーダ

一培養の iPS-CM は 5 日目より網状に構造を発達させ、30 日目にフィーダーレス培養と比較して多くの領域でサルコメア構造を示した (図 2Bb、白矢頭)。一方で、フィーダーレス培養の iPS 細胞は、5 日目から 30 日目にかけて多くの巨大な球状の凝集体を発達させた。球状の組織は表面に cTnT の発現が確認されたが、内部では検出されなかった (図 2Bc、破線の半円)。

遺伝子の発現

オンフィーダー培養およびフィーダーレス培養両方の条件下で、cTnT および Nkx2.5 の mRNA 発現レベルは、経時的に増加する傾向があった (図 3A)。対照的に、Oct4 および Sox2 の発現は、経時的に減少する傾向があった (図 3B)。

iPS-CM の収縮能の評価

オンフィーダー培養された iPS 細胞は、30 日目にフィーダーレス培養された iPS 細胞よりも収縮を示す領域および最大ベクトルがいずれも大きく、有意に大きな収縮能を示した (図 4 A、B)。オンフィーダー培養の iPS-CM は主にシート状構造を形成したが、フィーダーレス培養のものは基材上に組織が散在し球状の組織を形成した。

考察

以下に、フィーダー細胞としての HGF が iPS 細胞の心筋分化を促進することを示

す。線維芽細胞は、iPS 細胞を維持するためのフィーダー細胞として一般に使用され、これらはマウスおよびヒト起源のものに大別される¹²⁾。分化誘導するためのフィーダー細胞の使用は以前に報告されているが¹³⁾、MEF をフィーダー細胞として用いて生成された iPS 細胞誘導体の医学的応用は、長期培養による異種動物由来因子の混入のリスクを有する。したがって、ヒト起源の細胞が必要であり、線維芽細胞の場合は皮膚、角膜および肺を含む様々な組織から採取することができる¹⁴⁾。以前の研究では、包皮線維芽細胞を iPS 細胞の多能性を維持するためのフィーダー細胞として主に使用していたが^{12, 15)}、これらは一般に新生児から採取された。対照的に、HGF は、低侵襲で単純な外科手術を用いて患者の歯肉から容易に単離することができる。HGF は iPS 細胞の多能性維持のための魅力的なフィーダー細胞となりうると考えられているが¹⁶⁾、心筋細胞への分化誘導能および結果として生じる心筋組織の収縮性に関する過去の報告はない。本データは、本発明者らの方法を用いて、異種動物由来材料の非存在下で iPS 細胞を効率的に心筋細胞へ分化誘導したことを示している。フィーダーレス条件下では、ヒト起源のラミニン-511 E8 断片をコーティング剤として用い^{17, 18)}、異種動物由来材料の非含有培養条件を得た。

免疫染色は、オンフィーダー培養およびフィーダーレス培養の両方において、中胚葉マーカーである Nkx2.5 および心筋マーカーである cTnT のタンパク質発現を明らかにし、サルコメア構造を示した cTnT の発現は心筋細胞への分化を示唆した。さらに、オンフィーダー培養の iPS-CM は、より早い時点で cTnT を発現し、最終的に対照

と比較してより高い発現レベルを有していた。さらに、オンフィーダー培養の iPS-CM は、堅牢なシート状構造を形成した。一方でフィーダーレス培養では、DAPI 染色を伴う大きな凝集物を生じたが、cTnT の染色は生じなかった。さらに、細胞の脱落が分化誘導の後期で観察された。

qPCR において、cTnT および Nkx2.5 の mRNA 発現レベルは、両方の培養条件下で 5 日目と 30 日目の間に増加していた。また、Sox2 の発現はオンフィーダー培養では 5 日目に既に低かったが、Oct4 の発現は 5 日目と比較して 15 日目に減少していた。このことより iPS 細胞の心筋細胞への分化が示唆された。しかし、免疫染色とは対照的に、cTnT および Nkx2.5 の mRNA 発現レベルはフィーダーレス培養でより高かったが、Oct4 の発現レベルはより低かった。この矛盾は、iPS 細胞と HGF の共培養の溶解物中における HGF が iPS-CM の希釈を反映している可能性がある。したがって、基材から剥がした iPS-CM から HGF を除外した後、遺伝子発現のより正確な比較が必要と考えられる。

免疫染色および qPCR 実験は両方とも、iPS 細胞の心筋細胞への成熟を示した。これと一致して、心筋細胞成熟の最も重要な指標の 1 つである自発的な収縮¹⁹⁾が、分化誘導の開始後約 2 週間で観察された。iPS-CM は、両方の培養条件下で自発収縮を示したが、オンフィーダー培養のものはより強い収縮を示した。これは iPS-CM の構造的差異を反映している可能性が高く、2 次元的に発達した細胞構造が iPS-CM の収縮に有利であることを示唆している。Masuda らの先行研究における動物実験では、損

傷した心臓への心筋シートの移植が心機能を改善し得ることを示している²⁰⁾。したがって、オンフィーダー培養の iPS-CM のシートは、より強い収縮性を有することに加えて、収縮力の低下した心臓組織への移植に適している可能性がある。フィーダーレス培養では、細胞の構造が移植に適していない凝集体を形成した。特に、心臓移植片組織の臨床適用において、移植組織の収縮方向は、心臓の楕円形の形態維持を可能にし、血液の効率的な放出および流入を可能にするように宿主心筋細胞の収縮方向に向かわなければならない^{21,22)}。したがって、培養された心臓組織は、大きな球状の凝集体ではなく、シート状構造において強い収縮力を示すことが望ましい。

結論

本研究は HGF フィーダー細胞と共培養した iPS 細胞の心筋分化を評価し、フィーダーレス培養条件下で分化誘導した iPS 細胞よりも優れていることを実証した。重要なことは、本研究のプロトコルは、異種動物由来因子汚染のリスクを回避し、収縮力の強い心筋組織を産生することである。本研究の心筋組織は頑強な前臨床試験でさらに評価する必要があるが、本研究のプロトコルは、異種動物由来因子の非存在下での iPS 細胞から心筋細胞への分化につながった。今後の研究では、異種動物由来因子の混入のない条件下での臨床応用に十分な厚みを有する組織を開発する予定である。

謝辞

稿を終えるにあたり、懇篤なる御指導、御校閲を賜りました岡山大学大学院医歯薬

学総合研究科システム生理学分野、成瀬恵治教授、高橋賢助教に心より感謝の意を表します。そして主任教授であります岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科矯正学分野野上岡寛教授に謹んで感謝の意を表します。最後に本研究を行うにあたり、御援助と御協力をいただきました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科システム生理学分野の諸先生方に御礼申し上げます。

参考文献

1. World Health Organization : Fact sheet, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>, 2017.
2. 日本心臓移植研究会 : 日本の心臓移植レジストリ , <http://www.jsht.jp/registry/japan/>, 2015
3. Kilic, A., Emani, S., Sai-Sudhakar, C. B., Higgins, R. S. & Whitson, B. A. : Donor selection in heart transplantation., *J. Thorac. Dis.* **6**, 1097-104, 2014.
4. Duelen, R. & Sampaolesi, M. : Stem Cell technology in cardiac regeneration: a pluripotent stem cell promise., *EBioMedicine* **16**, 30-40, 2017.
5. Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. : Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells., *Nature* **448**, 313-317, 2007.
6. Rother, J., Richter, C., Turco, L., Knoch, F., Mey, I., Luther, S., Janshoff, A.,

- Bodenschatz, E., Tarantola, M. : Crosstalk of cardiomyocytes and fibroblasts in co-cultures., *Open Biol.* **5**, 150038, 2015.
7. Kim, C., Majdi, M., Xia, P., Wei, K. A., Talantova, M., Spiering, S., Nelson, B., Mercola, M., Chen, H. S. : Non-cardiomyocytes influence the electrophysiological maturation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes during differentiation., *Stem Cells Dev.* **19**, 783-795, 2010.
 8. Ieda, M., Tsuchihashi, T., Ivey, K. N., Ross, R. S., Hong, T. T., Shaw, R. M., Srivastava, D. : Cardiac fibroblasts regulate myocardial proliferation through beta1 integrin signaling., *Dev. Cell* **16**, 233-244, 2009.
 9. Tseng, Q., Duchemin-Pelletier, E., Deshiere, A., Balland, M., Guillou, H., Filhol, O., Théry, M. : Spatial organization of the extracellular matrix regulates cell-cell junction positioning., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **109**, 1506-1511, 2012.
 10. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. : NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis., *Nat. Methods* **9**, 671-975, 2012.
 11. Lien, C. L., Wu, C., Mercer, B., Webb, R., Richardson, J. A., Olson, E. N. : Control of early cardiac-specific transcription of Nkx2-5 by a GATA-dependent enhancer., *Development* **126**, 75-84, 1999.
 12. Du, S. H., Tay, J. C., Chen, C., Tay, F. C., Tan, W. K., Li, Z. D., Wang, S. : Human iPS cell-derived fibroblast-like cells as feeder layers for iPS cell derivation and expansion.,

- J. Biosci. Bioeng.* **120**, 210-217, 2015.
13. Pekkanen-Mattila, M., Ojala, M., Kerkelä, E., Rajala, K., Skottman, H., Aalto-Setälä, K. : The effect of human and mouse fibroblast feeder cells on cardiac differentiation of human pluripotent stem cells., *Stem Cells Int.* **2012**, 875059, 2012.
 14. Welgus, H. G. & Stricklin, G. P. : Human skin fibroblast collagenase inhibitor. Comparative studies in human connective tissues, serum, and amniotic fluid., *J Biol Chem.* **258**, 12259-12264, 1983.
 15. Yang, H., Qiu, Y., Zeng, X., Ding, Y., Zeng, J., Lu, K., Li, D. : Effect of a feeder layer composed of mouse embryonic and human foreskin fibroblasts on the proliferation of human embryonic stem cells., *Exp. Ther. Med.* **11**, 2321-2328, 2016.
 16. Yu, G., Okawa, H., Okita, K., Kamano, Y., Wang, F., Saeki, M., Yatani, H., Egusa, H. : Gingival fibroblasts as autologous feeders for induced pluripotent stem cells., *J. Dent. Res.* **95**, 110-118, 2016.
 17. Miyazaki, T., Futaki, S., Suemori, H., Taniguchi, Y., Yamada, M., Kawasaki, M., Hayashi, M., Kumagai, H., Nakatsuji, N., Sekiguchi, K., Kawase, E. : Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells., *Nat. Commun.* **3**, 1236, 2012.
 18. Miyazaki, T., Isobe, T., Nakatsuji, N. & Suemori, H. : Efficient adhesion culture of human pluripotent stem cells using laminin fragments in an uncoated manner., *Sci. Rep.*

- 7, 41165, 2017.
19. Ribeiro, M. C., Tertoolen, L. G., Guadix, J. A., Bellin, M., Kosmidis, G., D'Aniello, C., Monshouwer-Kloots, J., Goumans, M. J., Wang, Y. L., Feinberg, A. W., Mummery, C. L., Passier, R. : Functional maturation of human pluripotent stem cell derived cardiomyocytes in vitro--correlation between contraction force and electrophysiology., *Biomaterials* **51**, 138-150, 2015.
 20. Masuda, S. & Shimizu, T. : Three-dimensional cardiac tissue fabrication based on cell sheet technology., *Adv. Drug Deliv. Rev.* **96**, 103-109, 2016.
 21. Shapiro, E. P. & Rademakers, F. E. : Importance of oblique fiber orientation for left ventricular wall deformation., *Technol. Health Care* **5**, 21-28, 1997.
 22. Buckberg, G. D., Clemente, C., Cox, J. L., Coghlan, H. C., Castella, M., Torrent-Guasp, F., Gharib, M. : The structure and function of the helical heart and its buttress wrapping. IV. Concepts of dynamic function from the normal macroscopic helical structure., *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **13**, 342-357, 2001.
 23. Devalla, H. D., Schwach, V., Ford, J. W., Milnes, J. T., El-Haou, S., Jackson, C., Gkatzis, K., Elliott, D. A., Chuva de Sousa Lopes, S. M., Mummery, C. L., Verkerk, A. O., Passier, R. : Atrial-like cardiomyocytes from human pluripotent stem cells are a robust preclinical model for assessing atrial-selective pharmacology., *EMBO Mol Med.* **7**, 394-410, 2015.

24. Germanguz, I., Sedan, O., Zeevi-Levin, N., Shtrichman, R., Barak, E., Ziskind, A., Eliyahu, S., Meiry, G., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., Binah, O. : Molecular characterization and functional properties of cardiomyocytes derived from human inducible pluripotent stem cells., *J Cell Mol Med.* **15**, 38-51, 2011.
25. Page, R. L., Ambady, S., Holmes, W. F., Vilner, L., Kole, D., Kashpur, O., Huntress, V., Vojtic, I., Whitton, H., Dominko, T. : Induction of stem cell gene expression in adult human fibroblasts without transgenes., *Cloning Stem Cells* 11, 417-26, 2009.
26. Ma, B., Lei, X., Guan, Y., Mou, L. S., Yuan, Y. F., Yue, H., Lu, Y., Xu, G. T., Qian, J. : Maintenance of retinal cancer stem cell-like properties through long-term serum-free culture from human retinoblastoma., *Oncol Rep.* **26**, 135-43, 2011.
27. Oka, S., Leon, J., Tsuchimoto, D. Sakumi, K. & Nakabeppu, Y. : MUTYH, an adenine DNA glycosylase, mediates p53 tumor suppression via PARP-dependent cell death., *Oncogenesis* **3**, e121, 2014.

図の説明

図 1

ヒト歯肉線維芽細胞（HGF）および iPS 細胞の心筋細胞への分化のためのプロトコル

(A) ヒト歯肉組織の採取および HGF の単離および培養のためのプロトコルの概略図。

(B) 採取したヒト歯肉組織断片。(C) 心臓分化のための培養プロセスおよび免疫染色および qPCR 分析が実施された 3 つの時点の概略図。

図 2

iPS-CM の免疫染色

(A、B) オンフィーダーおよびフィーダーレス条件下での iPS-CM の免疫染色において、cTnT 陽性細胞（緑色）および Nkx2.5 陽性細胞（赤色）を示す。核は DAPI（青色）で染色された。(A) 5 日目、15 日目および 30 日目に蛍光顕微鏡を用いて画像を取得した。(B-a、b、c) 30 日目に共焦点顕微鏡を用いて取得した画像を重ね合わせた。(B-b) オンフィーダーの強拡大像は破線の四角形の領域を示す。矢頭はサルコメア構造を示す。(B-c) フィーダーレスの破線の半円は凝集体の表面を示す。

図 3

心筋マーカーおよび多能性マーカーの遺伝子発現

(A、B) 3つの時点でのオンフィーダーおよびフィーダーレス条件間の iPS-CM における mRNA 発現レベルの比較。オンフィーダー条件下での iPS-CM における遺伝子の相対的定量化は、5日目の発現レベルに対して示される (Y 軸)。データは、3つの異なる組織サンプルからの平均±標準誤差 (SEM) として示される。(A) cTnT (左) および Nkx2.5 (右) の遺伝子発現レベル。(B) Oct4 (左) および Sox2 (右) の遺伝子発現レベル。

図 4

収縮能の評価

(A) iPS-CM の収縮の解析は、image J ソフトウェアを用いて行った。オンフィーダー (上部) およびフィーダーレス (下部) 条件下で 30 日間、細胞を培養した。赤いベクトルは最大の収縮量を示し、青のベクトルは最小の収縮量を示します。

(B) 棒グラフは、異なる条件下での iPS-CM の収縮能を示す。データは、25 の異なる組織サンプルから平均±SEM として示す。 $p < 0.01$ 。

表 1. qRT-PCR に用いたプライマーの塩基配列

Primer	Direction	Sequence	Size (bp)	Ref.
Nkx2.5	forward	5' -TTCCCGCCGCCCGCCTTCTAT-3'	139	[23]
	reverse	5' -CGCTCCGCGTTGTCCGCCTCTGT-3'		
cTnT	forward	5' -GGCAGCGGAAGAGGATGCTGAA-3'	150	[24]
	reverse	5' -GAGGCACCAAGTTGGGCATGAACGA-3'		
Sox2	forward	5' -GCCGAGTGGAAACTTTTGTTCG-3'	154	[25]
	reverse	5' -GCAGCGTGTACTTATCCTTCTT-3'		
Oct4	forward	5' -CAGCGACTATGCACAACGAGA-3'	196	[26]
	reverse	5' -GCCCAGAGTGGTGACGGA-3'		
18S	forward	5' -CTTAGAGGGACAAGTGGCG-3'	71	[27]
	reverse	5' -GGACATCTAAGGCATCACA-3'		

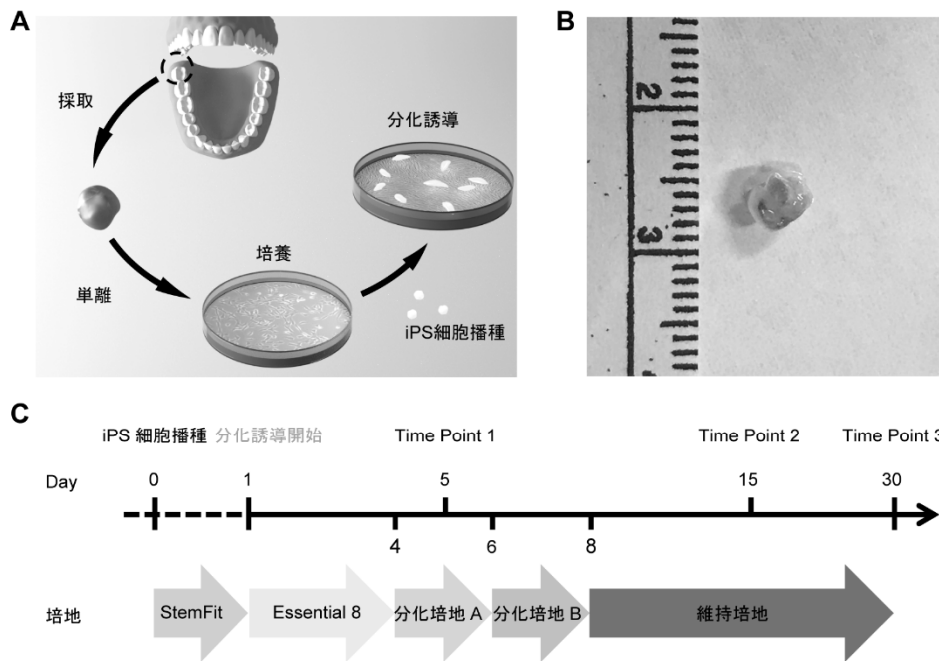


图1 松田 祐典

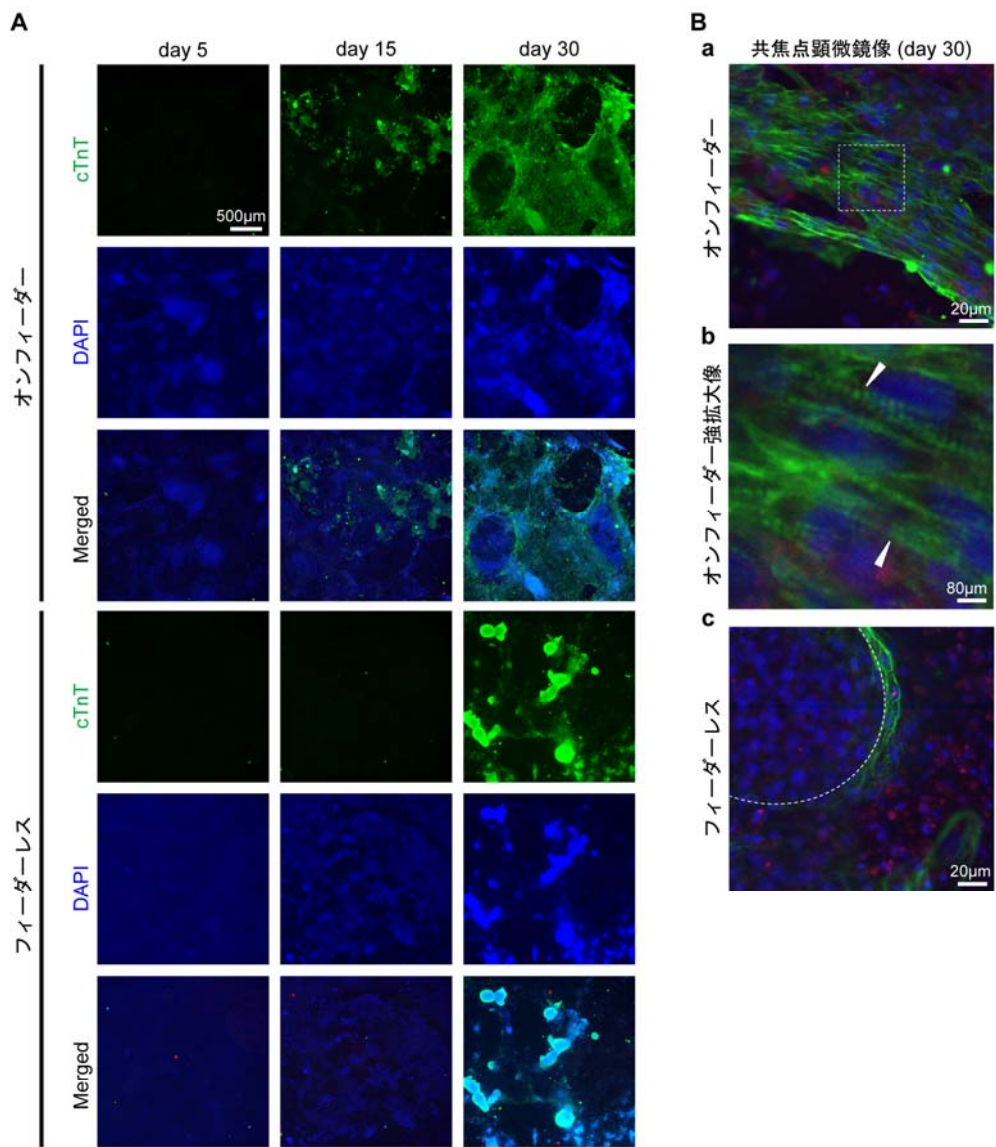


図2 松田 祐典

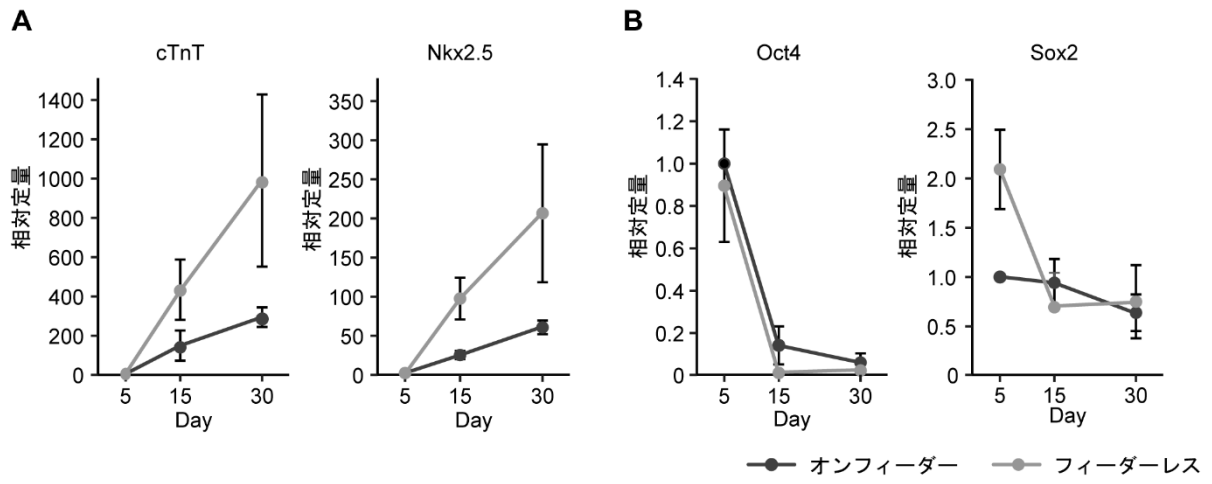


図3 松田 祐典

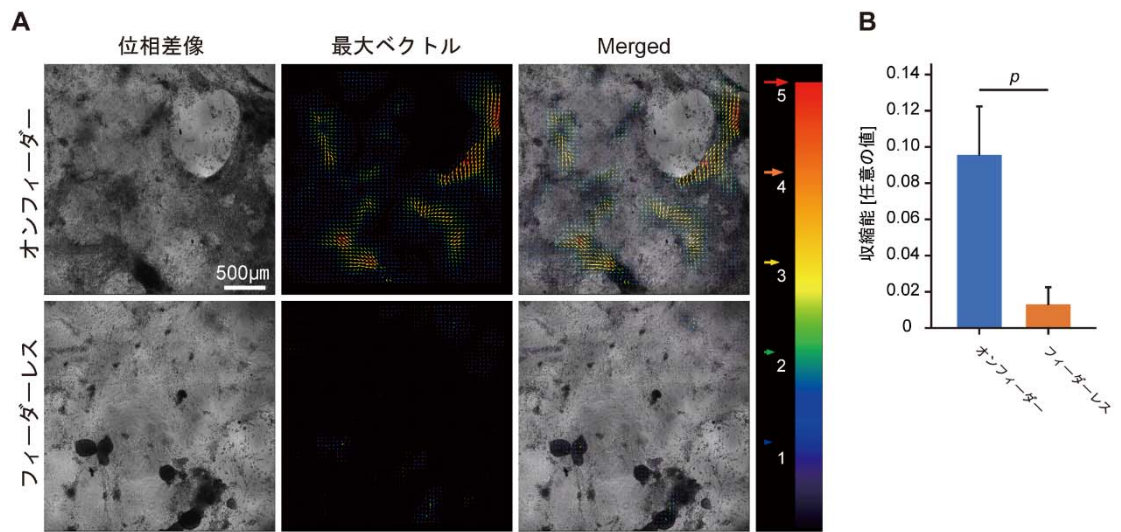


図 4 松田 祐典