(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7537726号
(P7537726)

(45)発行日　令和6年8月22日(2024.8.22)

(24)登録日　令和6年8月13日(2024.8.13)

(51)国際特許分類		FI	
C12N	*5/071(2010.01)*	C12N	5/071
C12N	*5/077(2010.01)*	C12N	5/077

請求項の数　3　（全26頁）

(21)出願番号　特願2020-17809(P2020-17809)
(22)出願日　令和2年2月5日(2020.2.5)
(65)公開番号　特開2021-122233(P2021-122233A)
(43)公開日　令和3年8月30日(2021.8.30)
審査請求日　令和4年12月8日(2022.12.8)
（出願人による申告）平成３０年度 国立研究開発法人日本医療研究開発機構、ＡＭＥＤと自治医科大学との委託研究開発契約「再生医療実現拠点ネットワークプログラム 幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム」「未成熟心筋細胞の成熟心筋細胞へのリプログラミングとその分子メカニズムの解明」及び平成２９年度 国立研究開発法人日本医療研究開発機構、ＡＭＥＤと大阪大学との委託研究開発契約、再生医療実現拠点ネットワークプログラム 技術開発個別課題「幹細胞培養用基材の開発
最終頁に続く

(73)特許権者　505246789
学校法人自治医科大学
東京都千代田区平河町二丁目６番３号
(74)代理人　100097113
弁理士　堀 城之
(72)発明者　魚崎 英毅
栃木県下野市薬師寺３３１１－１ 学校法人自治医科大学医学部内
(72)発明者　関口 清俊
大阪府吹田市山田丘１番１号 国立大学法人大阪大学内
審査官　坂崎 恵美子
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　細胞外マトリックス、成熟心筋細胞製造方法、及び心筋細胞成熟キット

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
未成熟の心筋細胞を成熟させるための細胞外マトリックスであって、
ラミニン断片を含み、
前記ラミニン断片は、ラミニン５１１　Ｅ８断片及び／又はラミニン５２１　Ｅ８断片である
ことを特徴とする細胞外マトリックス。
【請求項２】
未成熟の心筋細胞を、請求項１に記載の細胞外マトリックスを含む培地で培養し、
成熟した心筋細胞を取得する
ことを特徴とする成熟心筋細胞製造方法。
【請求項３】
未成熟の心筋細胞を成熟させるための細胞外マトリックスを含み、
前記細胞外マトリックスは、ラミニン断片を含み、
前記ラミニン断片は、ラミニン５１１　Ｅ８断片及び／又はラミニン５２１　Ｅ８断片である
ことを特徴とする心筋細胞成熟キット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】

本発明は、特に、多能性幹細胞等から分化誘導された未成熟の心筋細胞を成熟化させる細胞外マトリックス、成熟心筋細胞製造方法、創薬支援方法、治療方法、成熟心筋細胞、及び心筋細胞成熟キットに関する。

【背景技術】

【０００２】

日本生活習慣病予防協会（ＪＰＡＬＤ）の統計調査によると、特に成人以降に発症する心筋症等である心疾患の総患者数は１７２万９０００人（２０１６年４月１９日）、虚血性心疾患の年間死亡数、「急性心筋梗塞」３万７２２２人、「その他虚血性心疾患」３万４４５１人、心疾患による死亡数は年間１９万６１１３人（２０１６年１０月１３日）と報告されている。また、心筋梗塞が含まれる虚血性心疾患の医療費は７，５０３億円、このうち６５歳以上で５６３０億円を占める（２０１５年１１月１０日）。高齢化が進むことにより、これらが更に増加することが予想されている。

【０００３】

このような心疾患の治療のために、再生医療を用いることが検討されている。たとえば、ＥＳ細胞（Ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ）やｉＰＳ細胞（ｉｎｄｕｃｅｄ　Ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ　Ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌｓ）等の多能性幹細胞を分化誘導して心筋細胞を作成し、これを移植することで、十度の心疾患を治療可能になると考えられる。さらに、このような分化誘導して作成した心筋細胞を用いることで、心疾患の解析や薬剤の毒性評価を行う技術も期待されている。

【０００４】

ここで、特許文献１を参照すると、心筋細胞前駆細胞及び成熟心筋細胞を多能性幹細胞から分化させる方法が記載されている。この方法では、（ｉ）ラミニン５１１又は５２１及び（ｉｉ）ラミニン２２１の混合物を含む基材上で多能性幹細胞を分化させる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００５】

【文献】米国特許出願公開第２０１６／０１２２７１７号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００６】

しかしながら、特許文献１に記載された技術等を用いて、多能性幹細胞等から分化誘導して作成された心筋細胞は、胎児（胎仔）型～新生児型となり、完全に成熟した大人（成人、成体）の心臓の心筋細胞と同様にはならなかった。

【０００７】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、上述の課題を解消することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【０００８】

本発明の細胞外マトリックスは、未成熟の心筋細胞を成熟させるための細胞外マトリックスであって、ラミニン断片を含み、前記ラミニン断片は、ラミニン５１１　Ｅ８断片及び／又はラミニン５２１　Ｅ８断片であることを特徴とする。

本発明の成熟心筋細胞製造方法は、未成熟の心筋細胞を、前記細胞外マトリックスを含む培地で培養し、成熟した心筋細胞を取得することを特徴とする。

本発明の心筋細胞成熟キットは、未成熟の心筋細胞を成熟させるための細胞外マトリックスを含み、前記細胞外マトリックスは、ラミニン断片を含み、前記ラミニン断片は、ラミニン５１１　Ｅ８断片及び／又はラミニン５２１　Ｅ８断片であることを特徴とする。

【発明の効果】

【０００９】

本発明によれば、多能性幹細胞等に由来する未成熟の心筋細胞から、従来より成熟した成熟心筋細胞を得ることが可能な、ラミニン断片を含む細胞外マトリックスを提供するこ

とができる。
【図面の簡単な説明】
【００１０】
【図１】本発明の実施の形態に係る心筋細胞の写真である。
【図２】本発明の実施の形態に係る心筋細胞の写真である。
【図３】本発明の実施例に係る各細胞外マトリックス（ＥＣＭ）の各ステージでの発現をクラスタリングした結果を示すヒートマップである。
【図４】本発明の実施例に係る各ＥＣＭの発現プロファイルのグラフである。
【図５】本発明の実施例に係る各ＥＣＭによる成熟に対する影響の評価試験の概念図である。
【図６】本発明の実施例に係る各ＥＣＭ処理による成熟に対する影響の評価試験の結果を示すグラフである。
【図７】本発明の実施例に係る各ＥＣＭ処理による成熟に対する影響の評価試験の結果をまとめたグラフである。
【図８】本発明の実施例に係る各ＥＣＭ処理後の心筋細胞を免疫染色で形態評価した写真である。
【図９】本発明の実施例に係る各ＥＣＭ処理後の心筋細胞を免疫染色で形態評価した結果のグラフである。
【図１０】本発明の実施例に係るＬＮ５１１／５２１処理による心筋細胞の２核化の測定を示すグラフである。
【図１１】本発明の実施例に係るＬＮ５１１／５２１処理によるギャップジャンクションの形成を示す写真である。
【図１２】本発明の実施例に係るＬＮ５１１／５２１処理によるミトコンドリア活性の代表的なトレースのグラフである。
【図１３】本発明の実施例に係るＬＮ５１１／５２１処理によるミトコンドリア活性の評価のグラフである。
【図１４】本発明の実施例に係るＬＮ５１１／５２１処理による細胞内カルシウムのトランジェント現象の代表的なトレースのグラフである。
【図１５】本発明の実施例に係るＬＮ５１１／５２１処理による細胞内カルシウムのトランジェント現象の評価のグラフである。
【図１６】本発明の実施例に係るＬＮ５１１／５２１処理によるサルコメア短縮アッセイの結果を示す写真及びグラフである。
【図１７】本発明の実施例に係るＬＮ５１１／５２１処理によるトランスクリプトーム分析の全体の結果を示すグラフである。
【図１８】本発明の実施例に係るＬＮ５１１／５２１処理によるトランスクリプトーム分析の詳細解析の結果を示すグラフである。
【図１９】本発明の実施例に係るＬＮ５１１／５２１処理による成熟度スコアを示すグラフである。
【発明を実施するための形態】
【００１１】
＜実施の形態＞
　図１に、多能性幹細胞から分化誘導して得られる心筋細胞（以下、「ＰＳＣ－ＣＭｓ」という。）の例を示す。ＰＳＣ－ＣＭｓは、胎児（胎仔）型～新生児型となり、完全に成熟した心臓の心筋細胞と同様にはならないことが分かっている。たとえば、図１（ａ）は、マウスのＥＳ細胞のような多能性幹細胞から分化誘導したＰＳＣ－ＣＭｓの例を示す。図２（ｂ）は、実際のマウスの胎仔の心筋細胞の例を示す。図２（ａ）は、マウスのＥＳ細胞から分化誘導したＰＳＣ－ＣＭｓについて、それぞれ分化１０日目、図２（ｂ）は分化２０日目、図２（ｃ）は、分化３０日目の様子を示す。このように、ＰＳＣ－ＣＭｓは培養することで、多少、成熟するものの、マウス新生仔から単離した細胞と同程度にしかならない。このような状態では、マウス成体の細胞とは形態的にも大きな差がある。さら

に、細胞内のカルシウム量の変化を見るカルシウムトランジェントでも、その未成熟パターンであることは明らかであった。

このため、ＰＳＣ－ＣＭｓをより成熟させる成熟方法が求められていた。

【００１２】

ここで、本発明者らは、発達の各段階（ステージ）にある細胞外マトリックスが、時期特異的に発現していることを見いだした。

このため、鋭意実験を繰り返し、この時期特異的に発現している細胞外マトリックスのうち、どの細胞外マトリックスが、心筋細胞の成熟に特異的な効果を持つかどうかを、網羅的に調べた。この際に、心筋細胞が成熟するのに合わせて発現が増加する遺伝子座に対し、蛍光タンパク質を挿入した多能性幹細胞株（レポーター細胞）を用いた。

そして、ラミニンＥ８フラグメント（Ｅ８断片）に効果があり、更に、ラミニン５１１ｃＥ８断片及び／又はラミニン５２１　Ｅ８断片により、レポーター細胞の蛍光強度が増加し、形態や生理的な活性等が成熟することを確認して、本発明を完成させるに至った。

【００１３】

〔細胞外マトリックス〕

細胞外マトリックス（Ｅｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｍａｔｒｉｘ、細胞外基質、細胞間マトリックス）は、生物において、細胞の外に存在する不溶性物質である。細胞外マトリックスは、細胞にとって、物理的な足場となり、更に、組織の形態の形成、分化、ホメオスタシス等についての、生化学的、生物力学的なシグナルカスケードに関連する。動物において、細胞外マトリックスは、繊維状のタンパク質、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン等から構成される。このうち、繊維状のタンパク質は、コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、ラミニン（Ｌａｍｉｎｉｎ）を含む。このうち、ラミニンは、細胞外マトリックスである基底膜を構成する巨大なタンパク質である。

【００１４】

本実施形態の細胞外マトリックスは、心筋細胞の成熟を促進させるための特異的な細胞外マトリックスであり、ラミニン断片を含むことを特徴とする。

ここで、ラミニンは、３つの鎖（α鎖、β鎖、γ鎖）から構成される非常に大きなタンパク質である。本発明者らは、ラミニン全体を用いると、心筋細胞の成熟を逆に抑制して、前駆細胞の段階で安定的に止めてしまうことを見いだした。実際に、従来の組み換えラミニン５２１は、ヒト初期胚細胞で発現するラミニンとして、ヒト多能性幹細胞のような未分化の細胞を分化させずに維持させるのに用いられている（例えば、＜ＵＲＬ＝”ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｖｅｒｉｔａｓｔｋ．ｃｏ．ｊｐ／ｓｃｉｅｎｃｅｌｉｂｒａｒｙ／ｐｉｃｋｕｐ／ｌａｍｉｎｉｎ－５２１．ｈｔｍｌ”＞等参照）。

【００１５】

しかしながら、本発明者らは、上述の細胞外マトリックスの網羅的な解析により、従来のラミニン全体とは逆に、ラミニンタンパクの断片（ラミニン断片）を用いることで、心筋細胞の成熟を促進させることを見いだした。すなわち、本実施形態の細胞外マトリックスは、細胞の成熟を促すシグナル伝達分子として機能し、それ以外の、細胞の成熟を抑えるシグナル伝達分子の箇所を含まないものと考えられる。また、本実施形態のラミニン断片は、心筋細胞が成熟するのに必要である、構造的な足場を提供するため、心臓の発達に役立つと考えられる。

ここで、本実施形態のラミニン断片としては、Ｅ８断片を用いることが好適である。ラミニンのＥ８断片は、細胞表面のインテグリンと結合する最小構成部位のタンパク片（ペプチド鎖）である。このうち、ラミニン５１１及び／又はラミニン５２２のＥ８断片を用いることが、特に、ヒトやマウスを含む脊椎動物の心筋細胞の成熟化に好適である。このラミニン５１１及び／又はラミニン５２２　Ｅ８断片は、それぞれの種の配列のものを用いることが好適である。また、化学的に修飾されていても、ペプチドの配列が一部異なっていても、他のペプチドと合成されたものであっても、その他の化学的な修飾を受けたものであってもよい。

【００１６】

本実施形態の動物は、特に限定されるものではなく、心臓がありラミニンを備える脊椎動物及び無脊椎動物を広く含む。脊椎動物としては、魚類、両生類、は虫類、鳥類、及び哺乳類を含む。具体的には、例えば、哺乳類は、例えば、マウス、ラット、フェレット、ハムスター、モルモット、又はウサギ等のげっ歯類、イヌ、ネコ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、又は、アカゲザル、チンパンジー、オランウータン、ヒト等を含む霊長類等であってもよい。また、哺乳類の他にも、魚類、家禽を含む鳥類、爬虫類等を含む。また、無脊椎動物等であっても、脊索動物、軟体動物、環形動物、節足動物等、心臓を備える動物も広く含む。

【００１７】

本実施形態の心筋細胞は、各種の中胚葉系への分化誘導因子等を用いた手法により多能性幹細胞から分化されたＰＳＣ－ＣＭｓであってもよい。加えて、本実施形態の心筋細胞は、患者等の線維芽細胞や血液細胞に転写因子を導入して誘導されるｉｎｄｕｃｅｄ ｃａｒｄｉｏｍｙｏｃｙｔｅ（ｉＣＭ）であってもよい。さらに加えて、本実施形態の心筋細胞は、患者等の心臓から得られた初代培養（Ｐｒｉｍａｒｙ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ）心筋細胞であってもよい。

さらに、本実施形態の心筋細胞は、心筋細胞に分化誘導された細胞を、各種マーカーや目視等によりコロニー等の形式で選択したものであってもよい。また、本実施形態の心筋細胞は、各種細胞の混合細胞集団、組織、臓器等（以下、「組織等」という。）であってもよい。これらの心筋細胞は、後述する成熟度スコアで示されるような様々な状態のものを混合して含んでいてもよい。すなわち、各細胞は、十分分化していなかったり、未成熟であったり、成体の細胞程、成熟していなかったりしてもよい。さらに加えて、本実施形態の心筋細胞は、後述するレポーター細胞を分化誘導したものを含んでいてもよい。

また、以下、これらの心筋細胞のうち、成熟した心筋細胞を、単に「成熟心筋細胞」という。

【００１８】

ここで、本実施形態の多能性幹細胞は、例えば、ヒトを含む霊長類、霊長類以外のほ乳類、その他の脊椎動物等の生物で各種細胞に分化可能な、多分化能を備える幹細胞（Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ）を含む。ここで、本実施形態の多能性幹細胞は、継代可能であり、継代しても分化が進まない状態を保ち、核型等が変化しにくく、又はエピジェネティックな表現型が変化しにくい性質を有することが好適である。また、本実施形態の多能性幹細胞は、これに関連して、生体外（ｉｎ ｖｉｔｒｏ）又は生体内（ｉｎ ｖｉｖｏ）で十分な増殖能力を備えていることが好適である。このような本実施形態の多能性幹細胞の具体例としては、胚性幹細胞（Ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ、以下、「ＥＳ細胞」という。）、人工多能性幹細胞（Ｉｎｄｕｃｅｄ Ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ、以下、「ｉＰＳ細胞」という。）、その他の人工的に生成され若しくは選択された多能性を備える幹細胞等が挙げられる。これら本実施形態の多能性幹細胞は、特定の遺伝子を含むレトロウイルスやアデノウイルスやプラスミド等の各種ベクター、ＲＮＡ、低分子化合物等により、体細胞を再プログラミングして作成された幹細胞であってもよい。

なお、本実施形態の多能性幹細胞としては、必ずしも全能性に近い多分化能を備えている細胞である必要はないものの、通常より多分化能が高いナイーブ（Ｎａｉｖｅ）な細胞を用いることも可能である。また、本実施形態の多能性幹細胞は、疾患の患者から得られた細胞から作成された細胞、その他の疾患のモデルとなる細胞、レポーター遺伝子が組み込まれた細胞（レポーター細胞）、コンディショナルノックアウトが可能な細胞、その他の遺伝子組み換えされた細胞等であってもよい。この遺伝子組み換えは、染色体内の遺伝子の追加や修飾や削除、各種ベクターや人工染色体による遺伝子等の付加、エピジェネティック制御の変更、ＰＮＡ等の人工遺伝物質の付加、その他の遺伝子組み換えを含む。

【００１９】

〔成熟心筋細胞製造方法、成熟心筋細胞〕

本実施形態の成熟心筋細胞製造方法は、未成熟の心筋細胞を、本実施形態の細胞外マトリックスを含む培地で培養し、成熟した心筋細胞（成熟心筋細胞）を取得することを特徴

とする。

本実施形態の成熟心筋細胞は、本実施形態の成熟心筋細胞製造方法により製造された成熟心筋細胞であって、心筋細胞の成熟に伴い発現が増加する成熟心筋細胞マーカーを指標として、未成熟の心筋細胞から、成熟した心筋細胞（成熟心筋細胞）を取得することを特徴とする。

【００２０】

ここで、本実施形態の成熟心筋細胞マーカーは、心筋細胞の成熟に伴い発現が増加するＡｃａｄｖｌ、Ａｃｓｌ１、Ａｃｓｓ１、Ａｎｋｒｄ２３、Ａｑｐ１、Ａｔｐ１ａ２、Ｃａｓｑ２、Ｃｄ３６、Ｃｅｐ８５ｌ、Ｃｋｍｔ２、Ｃｌｕ、Ｃｍｙａ５、Ｃｏｑ１０ａ、Ｃｏｘ７ａ１、Ｃｏｘ８ｂ、Ｃｒｙａｂ、Ｄｃｎ、Ｅｃｈ１、Ｅｐｈｘ２、Ｆｎｄｃ５、Ｇｓｎ、Ｇｓｔｍ１、Ｈｆｅ２、Ｈｒｃ、Ｈｓｐｂ６、Ｈｓｐｂ８、Ｋｃｎｉｐ２、Ｋｌｆ９、Ｌｐｉ１、Ｌｒｒｃ２、Ｌｒｔｍ１、Ｍｂ、Ｍｇｐ、Ｍｙｏｍ２、Ｍｙｏｚ２、Ｍｙｚａｐ、Ｎｆｉｘ、Ｐｄｋ２、Ｐｅｒｍ１、Ｐｉｎｋ１、Ｐｔｇｄｓ、Ｒｇｓ５、Ｒｐｌ３ｌ、Ｓ１００ａ１、Ｓｇｃｇ、Ｓｌｃ２ａ４、Ｓｐａｒｃｌ１、Ｔｃａｐ、Ｔｍｅｍ１８２、Ｔｕｂａ４ａ、Ｔｘｌｎｂ、Ｘｉｒｐ２、及びＹｉｐｆ７からなる群の一種又は任意の組み合わせを含む。

このうち、Ｍｙｏｍ２は、成人の心筋で発現し、Ｍバンド構造を含むタンパク質の３次元配列を安定化するタンパクの遺伝子である。

【００２１】

具体的には、本実施形態の成熟心筋細胞は、上述の成熟心筋細胞マーカーの遺伝子座にレポーター遺伝子をノックインした多能性幹細胞を作成し、これをレポーター細胞として用いて、このレポーター細胞を成熟させることで製造可能である。

すなわち、まず、レポーター遺伝子をノックインした多能性幹細胞としてレポーター細胞を用意することが可能である。この上で、このレポーター細胞を分化誘導してＰＳＣ－ＣＭｓを作成し、レポーター遺伝子が活性化（発現）したものを指標としてフローサイトメトリーを用いた蛍光活性化セルソーティング（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ Ａｃｔｉｖａｔｅｄ Ｃｅｌｌ Ｓｏｒｔｉｎｇ、以下、「ＦＡＣＳ」という。）等で選択して取得することで、成熟心筋細胞を純化して取得することが可能である。

【００２２】

より具体的に、本実施形態のレポーター細胞は、例えば、赤色蛍光タンパク質（Ｒｅｄ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ、以下「ＲＦＰ」という。）やＧＦＰ緑色蛍光タンパク質（Ｇｒｅｅｎ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ、以下「ＧＦＰ」という。）等の蛍光タンパク質の遺伝子を成熟心筋細胞マーカーの遺伝子座にノックインして作成可能である。

【００２３】

さらに、本実施形態のレポーター細胞は、例えば、マウスＥＳ細胞を用いる場合、キメラマウスを作成することが可能であってもよい。これにより、レポーター細胞を、動物の心臓の発達段階に対する実験等に広く用いることが可能となる。具体的には、本実施形態のレポーター細胞は、心筋細胞の成熟をより進めるための、細胞外マトリックス（Ｅｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ Ｍａｔｒｉｘ、以下、「ＥＣＭ」とも省略する。）、ホルモン等の心筋細胞の成熟に関連する外部刺激のスクリーニング、成熟の最適化等に関するツールとして使用可能である。より具体的には、本実施形態のレポーター細胞は心臓病のモデリングや、後述する本実施形態の創薬支援方法において、治療薬の候補（候補薬物）、心疾患を治療するための候補薬物等のスクリーニングに用いることが可能である。

【００２４】

本実施形態の成熟心筋細胞は、上述のレポーター細胞を成熟させた蛍光を発する成熟心筋細胞をＦＡＣＳで取得して、純化することが可能である。この際、Ｃｄ３６については、表面抗原に対応する、蛍光色素結合した抗体を指標として、成熟度を評価して取得することが可能である。この表面抗原は、Ｃｄ３６の転写産物の細胞膜外の部分である。

以下の実施例では、Ｍｙｏｍ２に、レポーター遺伝子としてＲＦＰ遺伝子をノックイン

したレポーター細胞を用いる例を示している。

なお、蛍光タンパク以外にも、薬剤耐性遺伝子を導入した細胞を用意し、これを分化誘導してＰＳＣ－ＣＭｓを作成し、成熟することで薬剤耐性を獲得した心筋細胞を純化することも可能である。すなわち、薬剤耐性遺伝子を、広義の「レポーター」細胞として用いることが可能である。

【００２５】

上述のように、本実施形態の成熟心臓細胞は、レポーター細胞を成熟させたＰＳＣ－ＣＭｓであってもよい。または、レポーター遺伝子をノックインしていないＰＳＣ－ＣＭｓであってもよい。すなわち、本実施形態の成熟心筋細胞製造方法により製造された成熟心筋細胞は、上述のレポーター細胞を含む、多能性幹細胞を分化誘導した任意の心筋細胞を用いることが可能である。つまり、本実施形態の成熟心筋細胞は、レポーター細胞及びレポーター細胞以外のＰＳＣ－ＣＭｓを用いることも可能である。さらに、多能性幹細胞の分化誘導を行う際に、心筋細胞成熟剤を同時に用いることも可能である。または、心筋細胞成熟剤を多能性幹細胞の分化誘導のために用いてもよい。これらは、例えば、適当な核内移行するウイルスベクター、各種プラスミド、ＰＮＡ等を用いることが可能である。このウイルスベクターは、例えば、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス等の当業者に一般的なウイルスを用いて構成されてもよい。加えて、心筋細胞成熟剤を、適切なＤＤＳ（Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　Ｓｙｓｔｅｍ）、エレクトロポーション、その他の当業者に用いられる手法で細胞内、核内に導入することが可能である。

【００２６】

本実施形態の成熟心筋細胞製造方法にて製造されたＰＳＣ－ＣＭｓ（成熟心筋細胞）は、集合し線維状のサルコメア構造を形成することが可能である。本実施形態の成熟方法にて成熟させたＰＳＣ－ＣＭｓが培養された細胞塊中にサルコメア構造が認められる場合、心筋細胞が機能性の心筋を構成していると判定することが可能である。または、本実施形態の成熟方法にて成熟させたＰＳＣ－ＣＭｓの細胞塊の一部を取得し、本実施形態の成熟度評価方法にて成熟度スコアを評価することも可能である。

【００２７】

ここで、本実施形態の成熟心筋細胞製造方法にて製造された成熟心筋細胞は、生体内に存在する成人の心筋細胞と機能的及び形態的に近似した心筋細胞となる。すなわち、本実施形態の成熟心筋細胞は、細胞内カルシウムのトランジェント現象及びサルコメア短縮が観察され、ミトコンドリア活性が高くなる。さらに、イオンチャネル機能が発達し、例えば、静止膜電位、ピーク電圧、振幅等も、より生体内の成人の心筋細胞に類似した細胞となる。さらに、下記で説明するように、本実施形態の心筋細胞の成熟度評価方法で評価した場合、本実施形態のマウスの成熟心筋細胞は、高スコアになる。このため、従来の分化誘導方法において分化誘導した心筋細胞と、製造物として区別することが可能である。

【００２８】

本実施形態の成熟心筋細胞は、トランスクリプトームデータのうち、共通の遺伝子についての参照により、他の種の心筋細胞の成熟度を定量的に評価することで、実際の成熟度を評価することも可能である。すなわち、心筋細胞の成熟度評価方法により成熟度を評価して、この結果に対応して、成熟心筋細胞を取得することも可能である。これは、例えば、生体組織やＰＳＣ－ＣＭｓのコロニーの一部等を取得して、成熟度を評価し、残りの心筋細胞を取得するにして対応可能である。

【００２９】

ここで、本実施形態の発達段階にある動物の心臓のトランスクリプトームのデータは、例えば、次世代シーケンサーによる大規模ＲＮＡシークエンス（以下、「ＲＮＡ－ｓｅｑ」という。）、複数の遺伝子を設定した評価パネル（Ｔａｒｇｅｔｅｄ　ＲＮＡ－ｓｅｑ、又はｑＰＣＲ）、ＤＮＡチップ、その他の複数の遺伝子発現を測定したものを解析したデータを用いることが可能である。このデータは、例えば、受精からの日数に対応した胎児又は胎仔～出生後の新生児～成熟の各段階（ステージ）において、各遺伝子の発現量の

データを含んでいる。ＲＮＡ－ｓｅｑの場合、発現量は、転写産物の量であるＴｒａｎｓｃｒｉｐｔ ｐｅｒ ｍｉｌｌｉｏｎ（以下、「ＴＰＭ」という。）のデータとなる。

【００３０】

本実施形態においては、例えば、後述する実施例で示すように、発達の各段階にあるマウスの心臓のＲＮＡ－ｓｅｑによるトランスクリプトームデータのうち、マウスとヒトで共通の遺伝子を参照として、ヒトのｉＰＳ細胞から分化誘導されたＰＳＣ－ＣＭｓのＲＮＡ－ｓｅｑの結果データ１２０から、成熟度を評価することが可能である。すなわち、特にヒトＰＳＣ－ＣＭｓについて、どの程度成熟しているかを定量的に評価することが可能である。

【００３１】

本実施形態の成熟心筋細胞製造方法にて製造された成熟心筋細胞は、後述するように、本実施形態の創薬支援方法や治療方法に用いることが可能である。

なお、生物基礎医学分野において、特定の時点において、数万の遺伝子の発現と、生体細胞内において実際に進行している物質的、化学的変化、動作の関係とを完全に知ることは不可能である。よって、本実施形態のように遺伝子の発現レベル（トランスクリプトーム）を用いた成熟度スコア以上に、定量的に心筋細胞の成熟度を測定することは、当業者にとって非常に難しいため、本実施形態の成熟心筋細胞をその構造又は特性により直接特定することは困難であるという特段の事情が存在する。

【００３２】

〔心筋細胞成熟キット〕

本実施形態の心筋細胞成熟キットは、未成熟の心筋細胞を成熟させるための細胞外マトリックスを含み、細胞外マトリックスは、ラミニン断片を含むことを特徴とする。

本実施形態の心筋細胞成熟キットは、本実施形態の成熟心臓細胞の製造方法に必要な各種試薬を含む。これらの試薬には、例えば、培養用の培地、細胞外マトリックス、培地、ＦＡＣＳ用の試薬、抗体、容器等を含む。この細胞外マトリックスは、例えば、ラミニン５１１　Ｅ８断片及び／又はラミニン５２１　Ｅ８断片のペプチドを含んでいてもよい。さらに、細胞外マトリックスは、発現ベクター等として、心筋細胞自体やフィーダー細胞等で発現されるように提供されてもよい。加えて、上述のレポーター細胞自体、更に、各種ホルモンやアゴニスト、転写因子を含む心筋細胞成熟剤、その他が含まれる特別の培地や薬剤についても、本実施形態の心筋細胞成熟キットに加えられていてもよい。さらに、レポーター細胞を保存したり維持したりするための特別の培地、分化誘導や成熟に必要な薬剤等も含んでいてもよい。

【００３３】

〔創薬支援方法〕

本実施形態の創薬支援方法は、上述の成熟心筋細胞製造方法により成熟させた成熟心筋細胞を培養し、培養された成熟心筋細胞に対して、創薬のための毒性及び／又は疾患に関する薬物を投与し、成熟心筋細胞の状態を評価することを特徴とする。

【００３４】

本実施形態の創薬のための毒性及び／又は疾患に関する薬物としては、心毒性を調べる必要のある薬剤スクリーニングの候補薬物、心疾患を治療するための候補薬物等を用いることが可能である。本実施形態の候補薬物は、例えば、低分子化合物、ペプチド、タンパク質、細胞の抽出物や上清や発酵産物、その他の合成化合物や天然化合物等が挙げられる。これらの候補薬物は、純度や精製度等が任意であってもよい。また、本実施形態の薬剤スクリーニングが対象とする疾患は、心疾患以外の任意の疾患を含む。

【００３５】

本実施形態の心毒性としては、患者に重篤な不整脈を引き起こす疾患である、薬物誘発性（後天性）ＱＴ延長症候群を、下記で説明する生理学的特性の解析により評価してもよい。薬物誘発性ＱＴ延長症候群は、薬物の投与後に心電図上のＱＴ間隔の延長が起こり、ＴｄＰ（Ｔｏｒｓａｄｅｓ ｄｅ ｐｏｉｎｔｅｓ、トルサード・ド・ポアンツ、非持続性多形性心室頻拍）から、しばしば心室細動が起こり、失神や突然死をきたす、重篤な疾患

である。

【００３６】

本実施形態の成熟心筋細胞の状態の評価としては、生理学的特性の解析、毒性マーカー遺伝子の発現解析等を行うことで評価が可能である。このうち、生理学的特性の解析は、例えば、得られたＰＳＣ－ＣＭｓを１個の細胞又は細胞塊として、電気生理学的特性をパッチクランプ試験、又はフィールドポテンシャル（細胞外活動電位）等を測定して解析することが可能である。この細胞外活動電位は、例えば、多数の電極を有するディッシュ上に、サンプルを載せて測定する。細胞外活動電位の測定により、ＱＴインターバル、拍動（ＢＰＭ）解析、Ｎａピーク解析等を行うことが可能である。ＱＴインターバルは、心室筋の収縮から拡張期に入るまでの時間であり、Ｎａチャネルによる脱分極からＫチャネルによる再分極が起こり、静止膜電位となるまでの時間をいう。このＱＴインターバルが長くなるＱＴ延長が認められる場合、Ｋチャンネルの阻害による薬物誘導性の不整脈の原因となり得るので、スクリーニングにて不適なものとして候補薬物から除くような評価をすることが可能である。

【００３７】

この他にも、各種、毒性マーカー遺伝子の発現解析を行うことで、心毒性の評価が可能である。さらに、臨床試験のプロトコルに合わせたり、当業者に任意の方法を用いたりして、スクリーニングを行ってもよい。

これらの解析において、候補薬物を投与した成熟心筋細胞において、正常な機能が維持された場合に、当該候補薬物が心毒性の少ないものと推定可能である。

【００３８】

〔心疾患の治療方法〕

本実施形態の心疾患の治療方法は、本実施形態の成熟心筋細胞製造方法により製造された成熟心筋細胞を培養し、培養された前記成熟心筋細胞を移植することを特徴とする。

【００３９】

具体的には、本実施形態の治療方法においては、心臓の再生医療として、ヒトを含む動物の心臓疾患（心臓病、心疾患）を治療するために、本実施形態の成熟心筋細胞を用いることが可能である。この心疾患としては、心筋梗塞、虚血性心疾患、心筋炎、その他の心不全等が挙げられる。

たとえば、本実施形態の成熟心筋細胞は、当該患者から取得して作成又は生成された多能性幹細胞、又は、ＨＬＡ等の型が近い多能性幹細胞のライブラリーから取得され、分化誘導され、その後、心筋細胞成熟剤を加えて特定期間培養されて成熟させる。そして、成熟させた成熟心筋細胞は、分離された細胞又は細胞塊の状態で心疾患等の患者の疾病の心臓に注入、心筋シートや心筋組織や心臓臓器（以下、「心筋シート等」という。）を形成しての移植等の治療に用いることができる。この心筋シート等は、当業者に用いられる培養器材を用いて単層又は多層のシートを作成し、心疾患患者の心臓に移植してもよい。さらに、本実施形態の成熟心筋細胞を、サルコメア構造をもつ心臓の筋繊維や組織の状態にして、心疾患患者の心臓に移植してもよい。さらに、適切な担体を用いて培養したり、３Ｄプリンター等を用いて積層したりして、より組織化された培養物を心疾患患者の心臓に移植することも可能である。これらの担体や培養基材、及び／又は培地に、本実施形態の細胞外マトリックスを含ませることが可能である。

なお、本実施形態の成熟心筋細胞は、再生医療以外の治療用途、例えば、バイオリアクター、人工臓器の製造、クローン個体の作成等、各種用途に使用可能である。

また、本発明を日本で実施する場合、培養物の提供より後の治療は医師により行われるため、本発明の治療方法の「動物」は、ヒト（Ｈｏｍｏ　ｓａｐｉｅｎｓ）を含まないものとする。一方、それ以外の国においては、「動物」「治療法」の定義は、限定されない。

【００４０】

本発明の実施の形態に係る成熟心筋細胞を上述の治療に用いる際に、投与（導入）間隔及び投与量は、疾患の状況、さらに対象の状態等の種々の条件に応じて適宜選択及び変更することが可能である。

本発明の実施の形態に係る成熟心筋細胞の１回の投与量及び投与回数は、投与の目的により、更に、患者の年齢及び体重、症状及び疾患の重篤度等の種々の条件に応じて適宜選択及び変更することが可能である。

投与回数及び期間は、１回のみでもよいし、１日１回～数回、数週間程度投与し、疾患の状態をモニターし、その状態により再度又は繰り返し投与を行ってもよい。

【００４１】

加えて、本発明の成熟心筋細胞は、本実施形態の細胞外マトリックスに加えて、他の組成物や薬剤等と併用することも可能である。また、他の組成物と同時に本発明の組成物を投与してもよく、また間隔を空けて投与してもよいが、その投与順序は特に問わない。

また、本発明の実施の形態において、疾患が改善または軽減される期間は特に限定されないが、一時的な改善または軽減であってもよいし、一定期間の改善または軽減であってもよい。

【００４２】

さらに、本実施形態の細胞外マトリックスを、そのまま心筋細胞成熟用医薬として用いることも可能である。この医薬としては、例えば、未成熟の心筋細胞が存在することが原因となっている疾病、心筋シート等を移植された際の最終的な成熟等に用いることが可能である。具体的には、ゲル状物質等の各種担体に本実施形態の細胞外マトリックスを含ませたものを移植時に付加することが可能である。

【００４３】

また、本発明の実施の形態に係る心筋細胞成熟用医薬は、任意の製剤上許容しうる担体を含んでいてもよい。この担体は、例えば、リポソーム担体、コロイド金粒子、ポリペプチド、リポ多糖類、多糖類、脂質膜等であってもよい。これらの中で、機能活性調整剤の発現調整効果を向上させる担体を用いることが好適である。

【００４４】

さらに、製薬上許容される担体としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばＤ－ソルビトール、Ｄ－マンノース、Ｄ－マンニトール、塩化ナトリウム等を含んでいてもよい。さらに、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート８０（ＴＭ）、ＨＣＯ－５０等と共に投与することが可能である。また、適切な賦形剤等を更に含んでもよい。

【００４５】

また、本実施形態の心筋細胞成熟用医薬は、製剤上許容しうる担体を調製するために、適切な薬学的に許容可能なキャリアを含んでいてもよい。このキャリアは、シリコーン、コラーゲン、ゼラチン等の生体親和性材料を含んでもよい。また、キャリアは、乳濁液として提供されてもよい。さらには、例えば、希釈剤、香料、防腐剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、結合剤、乳化剤、可塑剤等の製剤用添加物のいずれか又は任意の組み合わせを含有させてもよい。

【００４６】

本実施形態の心筋細胞成熟用の投与経路は、特に限定されず、非経口的又は経口的に投与を行うことが可能である。非経口投与としては、例えば、静脈内、動脈内、皮下、真皮内、筋肉内、腹腔内の投与、又は、腎臓等への直接投与が可能である。

本発明の実施の形態に係る心筋細胞成熟用医薬は、非経口的又は経口的の投与に適した投与形態において、当該分野で周知の製剤上許容しうる担体を用いて処方され得る。

【００４７】

以上のように構成することで、以下のような効果を得ることができる。

従来、患者から得られた初代培養の心筋細胞は、ディッシュで維持することが困難であった。このため、多能性幹細胞に成長因子又は小分子を順次添加することにより、心臓分化誘導させるプロトコルが開発された。これにより生成された多能性幹細胞由来の心筋細胞（ＰＳＣ－ＣＭｓ）は、疾患モデリング及び薬物スクリーニングのために用いられることが期待されている。

【００４８】
ここで、従来のＰＳＣ－ＣＭｓは、その構造と機能に関して、胎児又は新生児の心筋細胞に近い未成熟の状態であり、典型的なｉｎ　ｖｉｖｏの出生後の成熟した心筋細胞とは異なっていた。そのため、特に成人以降に発症する心筋症等の心疾患の病態の再現や解析、薬剤の毒性評価を行う用途では不十分であった。この制限により、特にｉｎ　ｖｉｔｒｏモデル及び創薬のための医療目的でのＰＳＣ－ＣＭｓの有用性が毀損されていた。したがって、ＰＳＣ－ＣＭｓを、成体の細胞に近いレベルまで成熟させるための方法が求められていた。
【００４９】
これに対して、本実施形態のラミニン断片を用いてＰＳＣ－ＣＭｓを成熟させることで、従来の手法で得られるよりも明らかに成熟した成熟心筋細胞が得られた。
この本実施形態の成熟心筋細胞を疾患のモデルとなるｉＰＳ細胞等に応用することで、これまで病態が再現できなかったものであっても、再現できるようになる可能性がある。具体的には、心筋梗塞等、虚血性心疾患を原因とする特発性心疾患等についても候補薬物を選択可能になる。また、ＱＴ延長について、子供では症状がないものの大人では症状が出るといった状態に対応して、候補薬物をふるい分けることが可能となる。このため、心筋症治療に向けた再生医療への応用に資することができる。
【００５０】
一方、従来、特許文献１の段落［００５７］に記載されているように、全長のラミニン５１１及びラミニン５２１は、多能性幹細胞が接着可能な足場となり得るため、自発的な分化や遺伝的変化のリスクなしに、長期的に維持するのに用いられていた。一方、ラミニン２１１及びラミニン２２１は、心筋及び骨格筋線維（細胞）に非常に特異的であり、特許文献１の段落［００６０］に記載されているように、このラミニン２２１を含む基材で培養することで、多能性幹細胞をＰＳＣ－ＣＭｓに分化させていた。
すなわち、従来、ラミニン５１１及びラミニン５２１が多能性幹細胞から心筋細胞への成熟に有効であるという知見は存在しなかった。
これに対して、本実施形態のラミニン５１１　Ｅ８断片及び／又はラミニン５２１　Ｅ８断片は、従来の常識と異なり、それだけで未成熟の心筋細胞を成熟させ、成熟心筋細胞を作製させることが可能な細胞外マトリックスとなる。
【００５１】
さらに、本実施形態では、成熟に伴い発現が増加する成熟心筋細胞マーカーの遺伝子座に、レポーター遺伝子として蛍光タンパク質の遺伝子をノックインした多能性幹細胞であるレポーター細胞を用いた。そして、成熟心筋細胞（群）から、レポーター細胞におけるレポーター、又は、Ｃｄ３６の表面抗原を指標として、ＦＡＣＳ等で分離することにより、高純度な成熟心筋細胞を得ることができる。
本実施形態のレポーター細胞から作成した成熟心筋細胞は、病態モデルの作成が可能となり、心筋症の治療に向けた再生医療への応用に近づく可能性がある。たとえば、大人になって発症する心筋症の治療法開発に役立つ可能性がある。
【００５２】
より具体的には、本実施形態においては、実施例に示すように、Ｍｙｏｍ２遺伝子座にＲＦＰをノックインした多能性幹細胞株をラミニン５１１　Ｅ８断片及び／又はラミニン５２１　Ｅ８断片を用いて処理し、ＲＦＰ強度を測定することで、成熟心筋細胞を取得した。Ｍｙｏｍ２はニワトリ、マウス、ヒトの間で、強く保存されていることが知られている。このため、心筋細胞の成熟のレポーター細胞として、病態解析等に、より適切に使用可能となる。
【００５３】
なお、本発明者らは、Ｍｙｏｍ２以外にも、Ｃｋｍｔ２、Ｈｓｐｂ８、Ｔｃａｐについてノックイン細胞を作成済みであり、予備実験にて同様の結果を示した。これらでは、キメラマウスの作成も可能であり、胎仔～成熟したマウスの心臓を取得して、成熟した細胞を取得することが可能である。また、それ以外の成熟心筋細胞マーカーの遺伝子について

も、各遺伝子座にノックインを行うと同様の結果を示すものと考えられる。

【００５４】

また、上述の実施形態においては、セルソーティングにＦＡＣＳを用いる例について記載したものの、ＦＡＣＳ以外のセルソーティングも使用可能である。

【００５５】

以下で、本発明の実施の形態に係る細胞外マトリックス、成熟心筋細胞製造方法、創薬支援方法、心疾患の治療方法、成熟心筋細胞、及び心筋細胞成熟キットについて、具体的な実験を基にして、実施例としてさらに具体的に説明する。しかしながら、この実施例は一例にすぎず、これに限定されるものではない。

【実施例】

【００５６】

〔材料と方法〕

（ノックインＥＳ細胞株（レポーター細胞）の樹立）

心筋細胞の成熟度レポーター細胞は、マウスＥＳ細胞であるｓｙＮＰ４細胞に対し、ゲノム編集を行うことで樹立した。Ｍｙｏｍ２は骨格筋細胞でも発現しているため、ｓｏｄｉｕｍ－ｃａｌｃｉｕｍ ｅｘｃｈａｎｇｅｒ １ ｐｒｏｍｏｔｅｒによって駆動されるピューロマイシン耐性カセットを含んでいるｓｙＮＰ４株の細胞を用いることで、ｉｎ ｖｉｔｒｏで心筋細胞を、確実に純化することが可能となる。また、ゲノム編集はＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９によりゲノムを切断し、ノックインベクターを目的部位に挿入することで行った。Ｃａｓ９タンパク及びｓｉｎｇｌｅ ｇｕｉｄｅ ＲＮＡを一つのベクターから発現するｐｘ３３０のｇｕｉｄｅ ＲＮＡ ｃｌｏｎｉｎｇ位置に、Ｍｙｏｍ２のストップコドン直上となるｇｕｉｄｅ ＲＮＡを設計し、挿入したｐｘ３３０－Ｍｙｏｍ２を作成した。ノックインベクターはｇＲＮＡ標的部位より約１０００ｂｐのホモロジーアームを持ち、Ｍｙｏｍ２遺伝子と同一フレームでＴａｇＲＦＰが挿入されている。また、ＴａｇＲＦＰより下流にＦＲＴ－Ｂｌａｓｔｃｉｄｉｎ耐性遺伝子－ＦＲＴというカセットを持つ（Ｍｙｏｍ２－ＴａｇＲＦＰ－Ｂｌａｓｔ）。Ｐｘ３３０－Ｍｙｏｍ２、及びＭｙｏｍ２－ＴａｇＲＦＰ－ＢｌａｓｔをＳｙｎｐ４にリポフェクションで導入し、ｂｌａｓｔｃｉｔｉｄｉｎ処置を行うことで、ノックイン細胞を得た。ノックイン細胞はクロナール密度から培養することで、単一細胞由来のコロニーを得た。それぞれのコロニーについて、ノックインが正しく行われていることをＰＣＲ及びシーケンスで確認し、心筋細胞分化能が維持されていることを合わせて確認した。このようにして得られたＭｙｏｍ２－ＲＦＰノックインマウスＥＳ細胞を、ＳＭＭ１８と名付けた。さらに、ｐＣＡＧ－Ｆｌｐｅ－ＩＲＥＳ－ｐｕｒｏプラスミドをリポフェクションにより導入し、短期間のｐｕｒｏｍｙｃｙｎセレクションを行うことで、ＦＲＴ－Ｂｌａｓｔ－ＦＲＴカセットを喪失した、別のＭｙｏｍ２－ＲＦＰ株を樹立し、ＳＭＭ－Ｂ２と名付けた。カセットの喪失は薬剤の感受性試験及びＰＣＲにより確認した。本研究では、ＳＭＭ１８又はＳＭＭ－Ｂ２（以下、これらを単に「Ｍｙｏｍ２－ＲＦＰ株」という。）を用いて実験を行った。

【００５７】

（マウスＥＳ細胞の培養と分化誘導、ＥＣＭでの成熟処理）

Ｎｃｘプロモーター下にＰｕｒｏｍｙｃｉｎ耐性遺伝子を発現するトランスジェニックマウスＥＳ細胞（ｓｙＮＰ４）を、ＬＩＦ、ＣＨＩＲ０００２１、ＰＤ０３２５９０１、及び血清存在下で未分化維持培養を行い、週３回継代を行った。

分化誘導は、血清の代わりにＢ２７サプリメント（Ｖｉｔａｍｉｎ Ａ不含），Ｎ２サプリメント存在下で浮遊培養にて胚様体を形成させた。分化２日目からはＡｃｔｉｖｉｎ Ａ，ＢＭＰ４，ＶＥＧＦを加え、分化を継続した。分化４日目に胚様体をＴｒｙｐｌｅにより単離し、高密度平面培養（２５０ｋ ｃｅｌｌｓ／ｃｍ^{2}程度）をｂＦＧＦ，ＦＧＦ１０，ＶＥＧＦ存在下で行った。分化７日目頃より拍動する心筋細胞が観察される。Ｐｕｒｏｍｙｃｉｎを加えることにより、心筋細胞へと分化しなかった細胞を死滅させ、純度の高い心筋細胞を得た。また、この手法は以下で記載するノックイン細胞でも同様であった。

分化１０日目にはＴｒｙｐｌｅを用いて細胞を単離し、５０ｋ／ｃｍ^{2}で播種し直した。

播種する際には培養プレートを０．１％ゼラチンでコートしたものを用い、上記分化培地に１０％の血清を加えた（分化１１日目まで）。ウイルス感染は分化１１日目～１２日目にかけて行った。分化１２日目～１４日目はＰｕｒｏｍｙｃｉｎによる心筋細胞の純化を継続した。アゴニスト等を加えるアゴニスト処理については、分化１１日目～１４日目までＰｕｒｏｍｙｃｉｎ処理を行った後、分化１４日目から最大４週間アゴニスト等を添加する処理を行った。

ＥＣＭを加えて培養するＥＣＭでの成熟処理は、濃度０．１２５、０．５、１μｇ／ｃｍ^2、培養期間は１、２、４週で、それぞれ行った。

【００５８】

（ＲＮＡサンプルの調製とＲＮＡ－ｓｅｑｕｅｎｃｅ（ＲＮＡ－ｓｅｑ））

マウスの心臓を胎生１１日～生後１０ヶ月から摘出し、心房及び心室に分離、ＴＲＩｚｏｌを用いて溶解した。また、ＰＳＣ－ＣＭｓは、分化１０日目のものを０．１％ Ｇｅｌａｔｉｎ上に播種し、分化１４日目からアゴニスト処理を行い、２週後にＴＲＩｚｏｌにて溶解した。ＲＮＡの抽出は、マウス心臓についてはフェノールクロロホルム抽出、又はＤｉｒｅｃｔ－ｚｏｌ ＲＮＡ ｋｉｔ（ザイモリサーチ社製）、ＰＳＣ－ＣＭｓについてはＤｉｒｅｃｔ－ｚｏｌ ＲＮＡ ｋｉｔにより抽出した。ＲＮＡは、Ｎａｎｏｄｒｏｐ（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）又はＱｕｂｉｔ Ｆｌｕｏｒｏｍｅｔｅｒ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）を用いて定量した。また、Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒを用いて、ＲＮＡが分解されていないことを確認した。それぞれ５００ｎｇのＲＮＡを１００ｎｇ／ｕＬに調製し、ＱＵＡＮＴ－ｓｅｑ ３’ｍＲＮＡ－Ｓｅｑ Ｌｉｂｒａｒｙ Ｐｒｅｐ Ｋｉｔ（Ｌｅｘｏｇｅｎ社製）を用いて、ＲＮＡ－ｓｅｑ用のライブラリーを作成した。得られたライブラリーサイズはＢｉｏａｎａｌｙｚｅｒ（アジレント・テクノロジー株式会社製）を用いて確認し、その濃度はＢｉｏａｎａｌｙｚｅｒの結果ないしＱｕｂｉｔ Ｆｌｕｏｒｏｍｅｔｅｒを用いて定量した。それぞれのサンプルについて同量ずつになるよう混合し、Ｎｅｘｔ－ｓｅｑ ｈｉｇｈ ｏｕｔｐｕｔ ７５ＳＥ（イルミナ株式会社製）を用いて、超並列シーケンスを行った。なお、心臓サンプルは４８サンプルずつ、ＰＳＣ－ＣＭｓは９６サンプルずつ混合した。追加で行った心臓サンプルは、生後１０日目、３０週、１０ヶ月のものを、９６サンプルずつシーケンスした。

【００５９】

ＲＮＡ－ｓｅｑで得られたサンプルごとのＦａｓｔｑファイルは、ＢＢｔｏｏｌｓのＢＢＤｕｋを用いてｐｏｌｙ Ａ配列及びシーケンス末端の配列、アダプター配列、シーケンスクオリティの低い配列などをトリミングした。続いて、ＳＴＡＲ ＲＮＡ－ｓｅｑ ａｌｉｇｎｅｒを用いて、マウスゲノム（ＧＲＣ ｍｍ１０）へとマッピングを行った。最後にＳｕｂｒｅａｄ ｐａｃｋａｇｅに含まれるｆｅａｔｕｒｅ Ｃｏｕｎｔｓを用いてそれぞれの遺伝子ごとのカウントデータを得た。カウントデータは更に、独自に開発した心筋細胞成熟度評価プログラムと、統計解析用のプログラム「Ｒ」とを用いて解析を行った。まず、１００万カウント以下のサンプルを除外し、遺伝子ごとのカウントを総カウント数で除した、Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔ ｐｅｒ ｍｉｌｌｉｏｎ（ＴＰＭ）を各サンプル、各遺伝子について算出した。２０１９年８月末時点で実験済みの全ての実験データ（マウス）を用いて、平均して、１ＴＰＭ以上ある遺伝子を発現遺伝子と定義し、以下の解析では発現遺伝子のみを用いて解析を行った。

【００６０】

（定量的成熟度評価法（マウス））

マウスの胎仔（Ｅ）１１～生後（Ｐ）５６まで、さらに１０ヶ月までの各段階（Ｓｔａｇｅｓ）の心臓サンプルについてＲＮＡ－ｓｅｑを行った結果のデータについて、主成分分析を行い、成熟度スコア（Ｍａｔｕｒａｔｉｏｎ Ｓｃｏｒｅ）を算出する基準（以下、「参照」という。）となる各遺伝子の固有ベクトル（係数）を算出した。この際、ＴＰＭに１を加えた数字に、１０を底とする対数に変換した上で、主成分分析を行った。成熟度スコアは、各遺伝子発現に第一主成分に対応する係数を掛けたものの総和を用い、一定のオフセット値（３２）を加え、係数（１．５）を掛けることで得た。この計算により、

成熟度スコアは、概ね０～１００の幅となった。

【００６１】

（定量的成熟度評価法（ヒト））

ｂｉｏｍａＲｔ（ＲからＢｉｏＭａｒｔを利用するパッケージ）を用いて、ヒトとマウスで対応する遺伝子リストを得た。この際、ｈｓａｐｉｅｎｓ＿ｇｅｎｅ＿ｅｎｓｅｍｂｌと、ｍｍｕｓｃｕｌｕｓ＿ｇｅｎｅ＿ｅｎｓｅｍｂｌの２つのデータセットを用いた。同一遺伝子名を持つものに加えて、ｏｒｔｈｏｌｏｇｕｅとして単一の遺伝子が登録されている遺伝子を、対応リストとして設定した。

ヒト心筋細胞の定量的成熟度評価は、これらの遺伝子のＲＮＡ－ｓｅｑのデータをマウスのデータへと投写することで行った。ヒト胎児心臓ＲＮＡサンプル、ヒト成人心臓ＲＮＡサンプル、及び、ｉｎ ｈｏｕｓｅで分化誘導を行ったヒトＰＳＣ－ＣＭｓを用いて分化誘導後１８日目、３２日目、４６日目のサンプルについてＲＮＡ－ｓｅｑを行い、マウスのデータへ投写した。また、ヒトＰＳＣ－ＣＭｓについては、成熟を促進するホルモン処理として、Ｈｙｄｒｏｃｏｒｔｉｓｏｎｅ（ＨＣ）と甲状腺ホルモンＴ３の処理を行ったものも作成した。

具体的には、対応リストに含まれる遺伝子のみを用いて、上述の各サンプルについてのＲＮＡ－ｓｅｑのデータの主成分分析を行い、成熟度スコアを算出する基準となる各遺伝子の固有ベクトル（係数）を算出した。同様に、概ね０～１００の幅となるように、第一主成分得点に対し、オフセット値（３０）、係数（１．５）を算出した。

【００６２】

ヒト胎児心臓ＲＮＡサンプル、ヒト成人心臓ＲＮＡサンプルを用いてＲＮＡ－ｓｅｑを行い、マウスデータへ投写すると、胎児は胎仔相当に、成人は成体相当の成熟度スコアが得られた。また、ヒトＰＳＣ－ＣＭｓ分化誘導後１８日目、３２日目、４６日目のサンプルは、培養期間に伴い成熟度スコアが増加した。

【００６３】

（免疫染色）

心臓の場合、組織を埋め込み、最適切断温度（ＯＣＴ）コンパウンドで（Ｔｉｓｓｕｅ－Ｔｅｋ、Ｓａｋｕｒａ製）直接凍結し、Ｌｅｉｃａ Ｃｒｙｏｓｔａｔ（４μｍ）で切断した。切片は、ＰＢＳで洗浄してから４％パラホルムアルデヒド（ＰＦＡ、Ｗａｋｏ製）を用いて４°Ｃで３０分間処理し、固定した。その後、ＰＢＳで０．１％トリトンＸ－１００（アマーシャム バイオサイエンス社製）を用いて、室温で１５分間、切片を洗浄し、透明化した。透明化後、細胞を３％ウシ血清アルブミンでブロックし、続いて抗Ｍｙｏｍ２ポリクローナル抗体（ＬＳ－Ｂ９８４２、１：１００、ＬｉｆｅＳｐａｎ バイオサイエンス社製）、及び抗α－アクチニンモノクローナル抗体（ＥＡ－５３、１：１００、シグマアルドリッチ社製）を４°Ｃで一晩、反応させた。次いで、０．２％Ｔｗｅｅｎ－２０（ナカライテスク社製）を含むＰＢＳで洗浄し、二次抗体、抗ウサギＩｇＧ（１：５００、サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）、及び抗マウスＩｇＧ（１：５００、サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）で染色し、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ Ｐｌｕｓ ５５５及び４８８でそれぞれ重合させた。ＤＡＰＩ（Ｄｏｊｉｎｄｏ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ製）は、核染色に用いた。スライドは、ＶＥＣＴＡＳＨＩＥＬＤアンチフェード取り付け媒体（Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ製）に取り付けられまた。

【００６４】

ＰＳＣ－ＣＭｓの場合、ＣｅｌｌＣａｒｒｉｅｒ ９６ウェルブラックポリスチレンマイクロプレート（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ社製）で培養したＰＳＣ－ＣＭを４％パラホルムアルデヒドで一晩固定した。次に、細胞をＰＢＳで洗浄し、０．２％Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１０を含むＰＢＳ中を使用して、室温で１５分間透過処理した。透過処理後、細胞をＰＢＳ中の２％ＦＢＳでブロックした後、抗α－アクチニン抗体（１：５００、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社製）又は抗カーディアックトロポニンＴ抗体（１３－１１、１：５００、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）、及び抗ｔＲＦＰ抗体（Ａ

ＡＢ２３３、１：５００、Ｅｖｒｏｇｅｎ社製）で一晩処理した。細胞を洗浄し、二次抗体、抗マウスＩｇＧ（１：５００、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）及び抗ウサギＩｇＧ（１：５００、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）で染色し、それぞれＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８及び５５５と重合させた。核は、ＤＡＰＩ溶液で染色された。共焦点レーザー走査顕微鏡（オリンパス社製、ＦｌｕｏＶｉｅｗ ＦＶ１２００）又は倒立蛍光顕微鏡（オリンパス社製、ＩＸ８３）により免疫蛍光画像を収集した。サルコメアの長さ、細胞の大きさ、真円度、周囲、及び細胞の形状は、ＩｍａｇｅＪソフトウェアによって分析された。

【００６５】

（カルシウムトランジェントとサルコメア短縮）

細胞内カルシウムトランジェントを測定するために、ＰＳＣ－ＣＭｓを、ガラス底の２４ウェルプレート（ＭａｔＴｅｋ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ社製）で２８日間培養した。次に、細胞をＰＢＳで洗浄し、カルシウム指示薬Ｃａｌｂｒｙｔｅ ５２０－ＡＭ（ＡＡＴ Ｂｉｏｑｕｅｓｔ社製）を含むタイロード液（１４０ｍＭ ＮａＣｌ、５．４ｍＭ ＫＣｌ、０．５ｍＭ $MgCl_2$、０．３３ｍＭ NaH_2PO_4、２ ｍＭ$CaCl_2$、５ｍＭ ＨＥＰＥＳ、及び１１ｍＭ Ｄ－グルコース、ＮａＯＨでｐＨを７．４に調整）で３０分間、処理された。細胞は、１Ｈｚの電界刺激された（Ｃ－Ｐａｃｅ、ＩｏｎＯｐｔｉｃｓ社製）。倒立蛍光顕微鏡（オリンパス社製ＩＸ８３、ＯＲＣＡ－Ｆｌａｓｈ ４．０ Ｖ３搭載）により、４０倍の対物レンズ、露出１０ミリ秒、２０ミリ秒の間隔で細胞内カルシウムのトランジェント現象を記録した。ＩｍａｇｅＪを使用して、細胞内カルシウムトランジェントを定量化した。サルコメア短縮については、生細胞イメージング用のタイムラプス記録で細胞収縮を継続的に記録した。タイムラプス記録は、ＩｍａｇｅＪに対してＳａｒｃＯｐｔｉＭによって分析された。

【００６６】

（ミトコンドリア活性アッセイ）

ミトコンドリア機能をＳｅａｈｏｒｓｅ ＸＦ９６ ｅｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ｆｌｕｘ ａｎａｌｙｚｅｒで解析した。Ｓｅａｈｏｒｓｅ ＸＦ９６マイクロプレートを、０．１％ゼラチン（コントロール）又は各ＥＣＭでコーティングした。分化誘導後、１０日目に、ＰＳＣ－ＣＭｓを５００００細胞／ウェルの密度で、プレート上に播種した。アッセイを開始する前に、３８日目まで細胞を培養した。アッセイを実行する１時間前及び測定中に、培養培地をベース培地（１ｍＭ ピルビン酸、２ｍＭ グルタミン、２５ｍＭ グルコースを添加したＳｅａｈｏｒｓｅ ＸＦ ＲＰＭＩ培地）に交換した。選択的阻害剤は、最終濃度３μＭのオリゴマイシン（ミトコンドリア電子輸送チェーン［ＭＥＴＣ］の複合体Ｖ［ＡＴＰアーゼ］のための阻害剤）、０．５μＭのＣａｒｂｏｎｙｌ ｃｙａｎｉｄｅ－ｐ－ｔｒｉｆｌｕｏｒｏｍｅｔｈｏｘｙｐｈｅｎｙｌｈｙｄｒａｚｏｎｅ（ＦＣＣＰ、ミトコンドリア酸化リン酸化アンカプラー）、３μＭロテノン（ＭＥＴＣの複合体Ｉの阻害剤）、及びアンチマイシンＡ（ＭＥＴＣの複合体ＩＩＩの阻害剤）が、測定中に、逐次的に注入された。ミトコンドリア呼吸における主要な指標である基礎呼吸（Ｂａｓａｌ ｒｅｓｐｉｒａｔｉｏｎ）は、オリゴマイシンを適用する前に、酸素消費量率（Ｏｘｙｇｅｎ Ｃｏｎｓｕｍｐｔｉｏｎ Ｒａｔｅ、ＯＣＲ）で表された。ＡＴＰ産生関連呼吸（ＡＴＰ－ｌｉｎｋｅｄ ｒｅｓｐｉｒａｔｉｏｎ）は、オリゴマイシン感受性呼吸数で表された。プロトンリークは、オリゴマイシンとロテノン／アンチマイシンＡの割合との差分によって算出された。最大呼吸（Ｍａｘｉｍａｌ ｒｅｓｐｉｒａｔｉｏｎ、最大ミトコンドリア呼吸）はＦＣＣＰに対応して算出した。

【００６７】

（フローサイトメトリー）

Ｍｙｏｍ２－ＲＦＰ株から生成されたＰＳＣ－ＣＭｓを、ＴｒｙｐＬＥ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）にて１０分、３７℃で処理して、単一細胞に解離した。ＰＢＳで洗浄した後、細胞を、ＤＡＰＩ（１：２０００）を含むＰＢＳ中の２％ＦＢＳで懸濁した。ＲＦＰ陽性（以下「ＲＦＰ＋」と称する。）、及びＲＦＰ強度の割

合の測定と細胞選別は、ＳＨ８００（ＳＯＮＹ社製）を使用して実行された。

【００６８】

（統計分析）

データは、少なくとも３つの繰り返しサンプルの平均±標準偏差（ＳＤ）として表示された。トランスクリプトームデータ等、それ以下のサンプル数の実験については、すべてのデータ点を示した。スチューデントのｔ検定、デネット（Ｄｕｎｎｅｔｔ）検定、カイ２乗検定、又は一元配置分散分析は、適切な場所で使用された。統計分析はすべて、統計プログラム「Ｒ」を使用して行った。０．０５未満のｐ値（ｐ＜０．０５）は有意と見なされた。

【００６９】

〔結果〕

Ｍｙｏｍ２－ＲＦＰ株を心筋細胞の成熟のスクリーニングに使用できるかどうかをテストするために、ＰＳＣ－ＣＭｓの成熟に対する細胞外マトリックス（ＥＣＭ）の影響を調べた。心筋細胞の成熟を促進するＥＣＭの候補を特定するために、Ｅ１１からＰ５６までの各ステージの野生型マウス心室のＲＮＡ－ｓｅｑを実行した。

【００７０】

図３は、ＲＮＡ－ｓｅｑを行った際の各ＥＣＭの発現の階層的クラスタリングの結果を示す。濃度は正規化されたトランスクリプト（ＴＰＭ）を最も高い発現量で割り、発現量が低いもの又は高いものを濃色とした。

この階層的クラスタリングでは、初期胚、新生児、及び成熟したものの心室の遺伝子発現パターンがグループ化を示した。これらから、代表的なものを選択した。

【００７１】

図４は、発生時の心臓のラミニン、コラーゲン、フィブロネクチンを含むＥＣＭの発現プロファイル（Ｅ１１～Ｐ５６）を示す。フィブロネクチン（Ｆｎ１）、及びコラーゲンタイプＩＩ（Ｃｏｌ２ａ１）及びタイプＩＶ（Ｃｏｌ４ａ６）は、胎仔の心臓で豊富に発現した。また、コラーゲンタイプＩ（Ｃｏｌ１ａ１及びＣｏｌ１ａ２）及びＩＩＩ（Ｃｏｌ３ａ１）は、新生児の心臓で高度に発現上昇していた。一方、ラミニン（α２、α５、及びβ２）及びコラーゲンＩＶ型メンバーの１つ（Ｃｏｌ４ａ４）は、成熟したマウスの心臓で発現した。これにより、心筋細胞の発達、成熟時期に合わせたＥＣＭ発現があるという予測がなされた。

【００７２】

次に、図５により、ＥＣＭによる心筋細胞の成熟に対する影響の評価試験について説明する。具体的には、分化誘導１０日後に、各ＥＣＭとして、さまざまな濃度（０．１２５～１μｇ／ｃｍ^{2}の範囲）のラミニンＥ８断片（アイソフォーム１１１、１２１、２１１、２２１、３１１、３２１、３３２、４１１、４２１、５１１、及び５２１）、コラーゲン（Ｉ、ＩＩＩ、及びＩＶ型）、フィブロネクチン、及びコントロールの０．１％ゼラチン（Ｇｅｌａｔｉｎ）を、それぞれプレーティングした。その後、ＲＦＰ＋のＰＳＣ－ＣＭｓのＲＦＰ強度を定量的に測定するために、ＰＳＣ－ＣＭｓを７日間（１週間、１ｗ）、１４日間（２週間、２ｗ）、及び２８日間（４週間、４ｗ）、すなわち分化誘導後、計１７日～３８日間、培養した（以下、分化誘導後のＰＳＣ－ＣＭｓにＥＣＭを加えて、所定期間、培養することを「ＥＣＭ処理」という。後述する「ラミニン５１１／５２１処理」も同様である。）。その後、フローサイトメトリーを行った。

【００７３】

図６は、この各ＥＣＭの影響の評価の試験の結果を示す。具体的には、各ＥＣＭ処理として、分化誘導から１７日（ｄ１７、１ｗ）、２４日（ｄ２４、２ｗ）、３８日（ｄ３８、４ｗ）後に、ＲＦＰ＋のＰＳＣ－ＣＭｓの割合と、ＲＦＰ強度とを測定した。データは平均値±ＳＤ（ｎ＝３）、ＲＦＰの蛍光強度（ＲＦＰ強度）は任意単位（ａ．ｕ．）として示す。

結果として、ＲＦＰ＋のＰＳＣ－ＣＭｓの割合及びＲＦＰ強度の両方が１７～３８日まで増加したことが分かった。一部のＥＣＭのＰＳＣ－ＣＭｓでは、ＲＦＰ強度の増加が用

量依存的に観察された。

【００７４】

図７は、上述の図６における、分化の３８日目のＥＣＭの１μｇ／ｃｍ^{2}の結果をまとめたグラフである。Ｄｕｎｎｅｔｔ検定を使用して、各ＥＣＭの分画をコントロール（ゼラチン）と比較した。「＊」はＰ＜０．０５、「§」はＰ＜０．０１、「＃」はＰ＜０．００１、「†」はＰ＜０．０００１を、それぞれ示す。

これらのＥＣＭの中で、ＲＦＰ＋のＰＳＣ－ＣＭｓの割合は同じままであった。すなわち、成熟を惹起する効果はないと考えられた。これに対して、ＲＦＰ強度は、複数のＥＣＭで増加した。特に、ラミニン５１１　Ｅ８断片、及びラミニン５２２　Ｅ８断片（以下、「ラミニン５１１／５２１」と省略する。）は、他と比較して、最も高いＲＦＰ強度を示した。この結果は、ＥＣＭ、特にラミニン５１１／５２１が、成熟を惹起するのではなく、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで心筋細胞の成熟を促進したことを示唆している。

【００７５】

図８は、ラミニン５１１が心筋細胞の成熟を促進するかどうかを検証するために、ＰＳＣ－ＣＭｓ上のＥＣＭの構造と形態を調べた写真である。図８（ａ）はＴａｇＲＦＰ、図８（ｂ）はα－アクチニン抗体、図８（ｃ）は核のＤＡＰＩで、それぞれ染色したものを示す。スケールバーは、２０μｍである。

各ＥＣＭで処理すると、特に、細胞サイズ及びサルコメア長が増加していた。

【００７６】

図９は、構造的及び形態学的特徴についての測定結果を統計計算した結果を示す。図９（ａ）はサルコメア長（μｍ）、図９（ｂ）は細胞長（μｍ）、図９（ｃ）は細胞面積（μｍ^2）、図９（ｄ）は細胞幅（μｍ）について、それぞれ、測定結果をバイオリンプロットにより表現した。このバイオリンプロットにおいて、白いボックスの黒い線は中央値を示し、ボックスの制限は２５パーセンタイルと７５パーセンタイルを示し、ウィスカーは２５パーセンタイルと７５パーセンタイルの四分位範囲の１．５倍を示し、多角形はデータの密度推定値を示し、極値まで描画した。

【００７７】

結果として、ＥＣＭ処理した心筋細胞は、特にラミニン（ＬＮ）５１１／５２１による処理で、コントロール（ゼラチン）と比較して、サルコメア長、細胞面積、細胞長、及び細胞幅の有意な増加を示した。

また、Ｄｕｎｎｅｔｔ検定を使用して、各ＥＣＭ治療をコントロール（ゼラチン）と比較した。「＊」はＰ＜０．０５、「§」はＰ＜０．０１、「＃」はＰ＜０．００１、「†」はＰ＜０．０００１であることを示す。すると、ラミニン５１１／５２１で培養されたＰＳＣ－ＣＭｓは、細胞サイズ、細胞長、及び細胞幅の有意な増加を示した。さらに、ＰＳＣ－ＣＭｓのサルコメア長は、コントロールと比較してラミニン－５１１／５２１で長かった。

これらの結果は、ラミニン５１１／５２１が、心筋細胞の構造的成熟を強く促進することを示した。

【００７８】

次に、ラミニン５１１／５２１がＰＳＣ－ＣＭの機能的および転写成熟を増強したかどうかの詳細解析として、まず細胞の２核化について調べた。

【００７９】

図１０は、ラミニン５１１／５２１処理して培養したＰＳＣ－ＣＭｓにおける単核細胞と２核細胞の割合を、ゼラチンと比較したものである（ｎ＞１００）。薄色が単核細胞（Ｍｏｎｏｎｕｃｌｅａｒ　Ｃｅｌｌｓ）、濃色が２角細胞（Ｂｉｎｕｃｌｅａｒ　Ｃｅｌｌｓ）の割合を示す。「†」は、Ｐ＜０．０００１有意であることを示す。

結果として、ラミニン５１１／５２１処理したＰＳＣ－ＣＭｓは、コントロールのゼラチン（７．７７％）よりも、２核細胞の集団が多くなった。具体的には、ラミニン５１１　Ｅ８断片では３８．６８％、ラミニン５２１　Ｅ８短辺では５４．７２％であった。

【００８０】

次に、心筋細胞成熟を反映したギャップ接合タンパク質であるコネキシン－４３（Ｃｘ４３）の局在化により、ラミニン５１１／５２１処理で、ギャップジャンクションが形成されるかどうか調べた。

ここで、胚性心筋細胞では、Ｃｘ４３は細胞質中で拡散発現される。その後、新生児から若年期には、心筋細胞の側面に局在する。心筋細胞が完全に成熟すると、Ｃｘ４３は主に心筋細胞のインターカレーションディスクに局在化する。このような形態変化が見られるかどうか観察した。

【００８１】

図１１は、分化後３８日目に、Ｃｘ４３用に染色されたＰＳＣ－ＣＭｓの代表的な写真を示す。スケールバーは、２０μｍである。

コントロールのゼラチン上のＰＳＣ－ＣＭｓは、Ｃｘ４３を弱く発現した。これに対して、ラミニン５１１／５２１処理したＰＳＣ－ＣＭｓは、細胞の側面にＣｘ４３を強く発現した。すなわち、ラミニン５１１／５２１処理での培養により、ギャップジャンクション（Ｃｘ４３）が形成されていた。

これらの結果は、ラミニン５１１／５２１処理により、ＰＳＣ－ＣＭｓがより成熟し、少なくとも、新生児又は若年期の段階に達したことを示唆した。

【００８２】

次に、酸素消費量率（ＯＣＲ）を用いたＰＳＣ－ＣＭｓのミトコンドリア活性について測定した。心筋細胞は、出生後、エネルギー産生のために糖質を脂肪酸酸化させるためである。

【００８３】

図１２は、ラミニン５１１／５２１処理したＰＳＣ－ＣＭｓ及びゼラチンについて、オリゴマイシン、ＦＣＣＰ、及び、ロテノン／アンチマイシンＡに対応する代表的なトレースを示す。

図１３（ａ）は基礎呼吸、図１３（ｂ）はＡＴＰ産生関連呼吸、図１３（ｃ）はプロトンリーク、図１４（ｄ）は最大呼吸についてのＯＣＲの統計分析結果を示す。データは平均値±ＳＤ（ｎ＝３）として示される。ラミニン上のＰＳＣ－ＣＭｓとゼラチン上のＰＳＣ－ＣＭｓを対照として比較するために、Ｄｕｎｎｅｔｔ検定を行った。「＊」はＰ＜０．０５、「§」はＰ＜０．０１、「＃」はＰ＜０．００１、「†」はＰ＜０．０００１であることを示す。

結果として、ラミニン５１１／５２１処理したＰＳＣ－ＣＭｓは、基礎呼吸及び最大呼吸レベルがより高く、コントロールのゼラチン上のＰＳＣ－ＣＭｓよりも高いミトコンドリア活性を示唆した。

【００８４】

次に、生理学的変化をさらに調べるために、ラミニン５１１／５２１処理したＰＳＣ－ＣＭｓのカルシウムトランジェントについて調べた。

【００８５】

図１４は、３８日目に１Ｈｚで刺激されたカルシウムトランジェントの代表的なトレースを示す。ラミニン－５１１／５２１で培養したＰＳＣ－ＣＭｓと、ゼラチンのコントロールとを比較した。

図１５（ａ）は、カルシウムトランジェントのピークまでの時間の平均値、図１５（ｂ）はピーク振幅、図１５（ｃ）は減衰時間（ｎ＞８０）を示す。Ｄｕｎｎｅｔｔ検定にて、「＊」はＰ＜０．０５、「†」はＰ＜０．０００１であることを示す。

結果として、ラミニン５２１処理したＰＳＣ－ＣＭｓは、ピークまでの時間が大幅に短縮され、減衰までの時間も有意に減少し、ピーク振幅も高かった。

【００８６】

次に、ラミニン５１１／５２１処理したＰＳＣ－ＣＭｓのサルコメア短縮についても調べた。

【００８７】

図１６（ａ）は、電気パルス（１Ｈｚ）刺激中のサルコメア長の代表的なトレースを示

す。図１６（ｂ）は、サルコメア短縮の平均データを示す。データは平均±ＳＤ（ｎ＞４０）として示される。Ｄｕｎｎｅｔｔ検定にて、「＊」はＰ＜０．０５、「§」はＰ＜０．０１であることを示す。

結果として、ラミニン５１１／５２１処理を行うと、サルコメア短縮の割合を有意に増加させることが分かった。

これらの結果は、ラミニン５１１／５２１処理にて、ＰＳＣ－ＣＭの生理特性を改善することを示した。

【００８８】

次に、ラミニン５１１／５２１処理したＰＳＣ－ＣＭｓのトランスクリプトーム解析を行った。

【００８９】

図１７は、トランスクトリーム解析として、生物学的プロセスに対して選択された８つのＧＯタームの遺伝子の合計発現を示す。観察された形態学的又は生理学的変化と比較して、特定のＧＯタームの発現は、大まかには変化しなかった。

図１８は、トランスクトリームの詳細な分析を行った結果を示す。上述の合計発現と異なり、ゼラチンと比較すると、心筋細胞の発達に関連する既知の遺伝子は、ラミニン５１１／５２１処理されたＰＳＣ－ＣＭｓでアップレギュレートされた。たとえば、心臓マーカー遺伝子（Ｔｎｎｔ２及びＡｃｔｃ１）、心臓遺伝子発現に関する転写因子の遺伝子（Ａｎｋｒｄ２３）、カルシウム関連遺伝子（Ｃａｓｑ２）、及びサルコメア遺伝子（Ｍｙｂｐｃ２、Ｍｙｂｐｃ３、Ｍｙｈ７、及びＭｙｌ２）等である。

これらの結果によれば、サルコメア遺伝子と成熟関連遺伝子とは、ラミニン５１１／５２１処理されたＰＳＣ－ＣＭｓでアップレギュレートされる傾向があり、ＥＣＭの効果は、転写量の変化ではなく、翻訳量の変化であることが示唆された。

【００９０】

次に、ラミニン５１１／５２１処理したＰＳＣ－ＣＭｓについて、どの程度成熟しているのかを定量的に測定するため、トランスクリプトームに基づく心筋細胞成熟度評価を行った。

【００９１】

図１９は、成熟度スコアを解析した結果を示すグラフである。Ｍｙｏｍ２－ＲＦＰ株を分化誘導後１０日後から２週間（２ｗ）及び４週間（４ｗ）、ラミニン５１１／５２１処理したＰＳＣ－ＣＭｓと、ゼラチンのみのコントロールのＰＳＣ－ＣＭｓとをフローサイトメトリーでセルソーティングして取得した後、成熟度スコアを測定した。

結果として、ラミニン５１１／５２１処理したＰＳＣ－ＣＭｓは、２ｗであっても、ゼラチンで４ｗ培養したものよりも成熟していた。

【００９２】

以上をまとめると、Ｍｙｏｍ２－ＲＦＰ株を分化したＲＦＰ＋のＰＳＣ－ＣＭｓは、ラミニン５１１／５２１処理により、サルコメア短縮が観察され、ＲＦＰ－のＰＳＣ－ＣＭｓよりも形態的、構造的、機能的に成熟していた。よって、ラミニン５１１／５２１処理したＰＳＣ－ＣＭｓを取得することで、成熟心筋細胞を取得可能となる。

【００９３】

なお、上述の結果では示していないものの、予備的な実験において、ヒトのＰＳＣ－ＣＭｓについても、ラミニン５１１／５２１処理を行って、成熟度スコアを評価している。これにより、実際に、ゼラチン等のコントロールと比べて、成熟度が増加していることを確認している。

【００９４】

なお、上記実施の形態の構成及び動作は例であって、本発明の趣旨を逸脱しない範囲で適宜変更して実行することができることは言うまでもない。

【産業上の利用可能性】

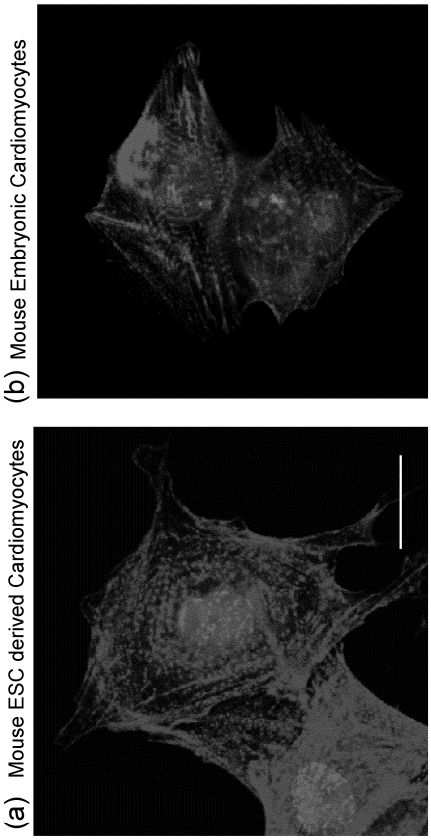
【００９５】

本発明によれば、成熟心筋細胞製造方法により実際に成熟した心筋細胞を提供し、これ

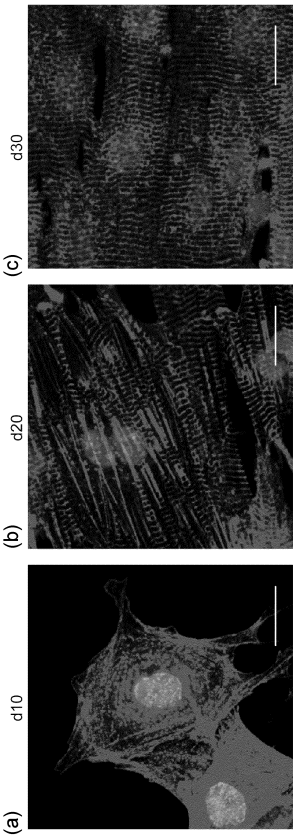
を移植医療や創薬支援等に用いることができ、産業上利用可能である。

【図面】

【図１】



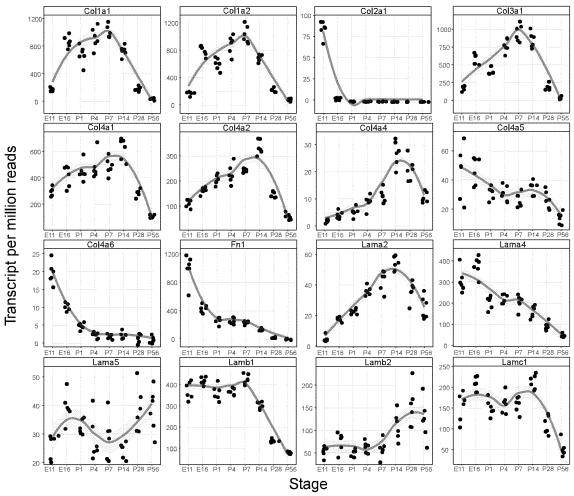
【図２】



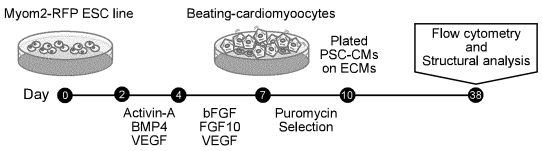
【図３】

Col28a1
Col6a5
Col6a4
Col19a1
Hapln2
Col17a1
Col10a1
Col24a1
Col2a1
Hapln1
Col9a3
Col9a1
Col13a1
Vcan
Lama1
Lamc3
Col8a2
Col11a1
Col12a1
Col4a5
Col27a1
Lama4
Col16a1
Lamc2
Col25a1
Col22a1
Col9a2
Col26a1
Tnc
Fbn2
Col4a6
Fn1
Col18a1
Col23a1
Col7a1
Fbln1
Ecm1
Col4a1
Col4a2
Col6a2
Col6a3
Fbln5
Col3a1
Col1a1
Col1a2
Col14a1
Col6a6
Postn
Lama5
Bgn
Fbln2
Fbn1
Lamc1
Nid1
Agrn
Vim
Lamb1
Col5a1
Col5a2
Col11a2
Eln
Col6a1
Col15a1
Col20a1
Lama3
Col4a3
Dcn
Ecm2
Dpt
Dpt
Lama2
Lum
Col4a4
Col5a3
Col8a1
Vtn
Lamb2
Lamb3
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
E11
E16
P1
P4
P7
P14
P28
P56

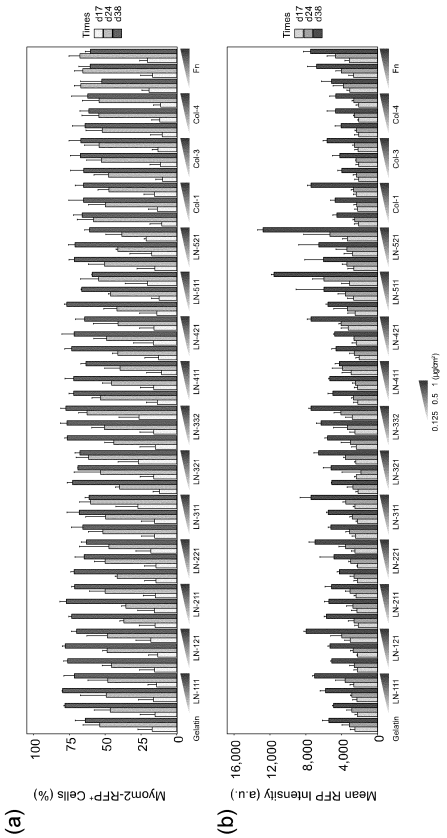
【図４】


Transcript per million reads
Stage
Col1a1
Col1a2
Col2a1
Col3a1
Col4a1
Col4a2
Col4a4
Col4a5
Col4a6
Fn1
Lama2
Lama4
Lama5
Lamb1
Lamb2
Lamc1
E11 E16 P1 P4 P7 P14 P28 P56

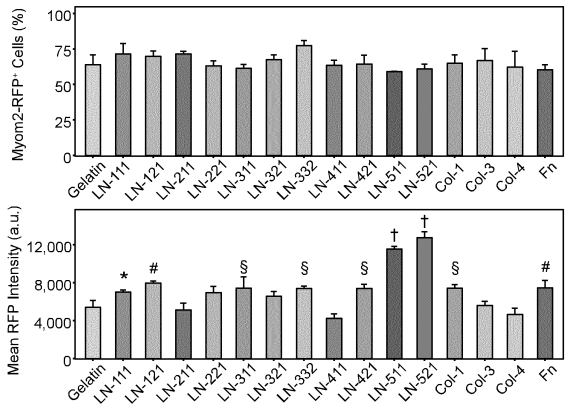
【図５】


Myom2-RFP ESC line
Beating-cardiomyoocytes
Plated
PSC-CMs
on ECMs
Flow cytometry
and
Structural analysis
Day
0
2
4
7
10
38
Activin-A
BMP4
VEGF
bFGF
FGF10
VEGF
Puromycin
Selection

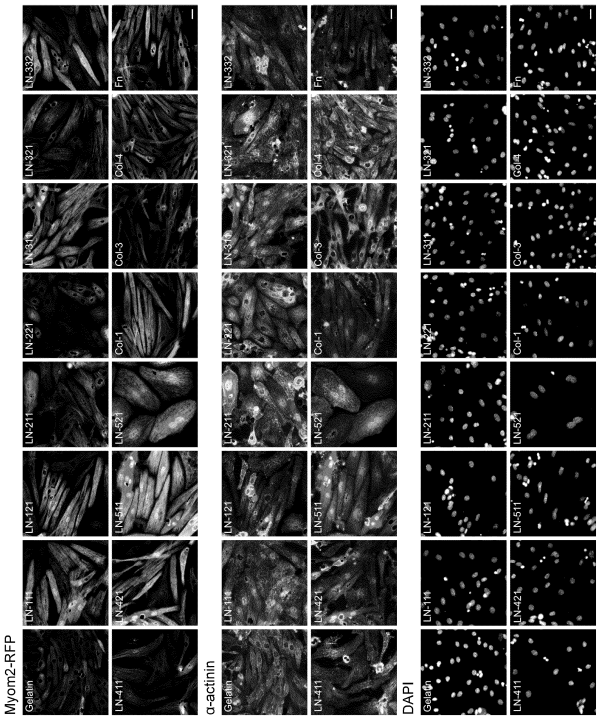
【図６】


(a)
Myom2-RFP+ Cells (%)
100
75
50
25
0
(b)
Mean RFP Intensity (a.u.)
16,000
12,000
8,000
4,000
0
Times
d17
d24
d38
Gelatin
LN-111
LN-121
LN-211
LN-221
LN-311
LN-321
LN-332
LN-411
LN-421
LN-511
LN-521
Col-1
Col-3
Col-4
Fn
0.125 0.5 1 (μg/cm²)

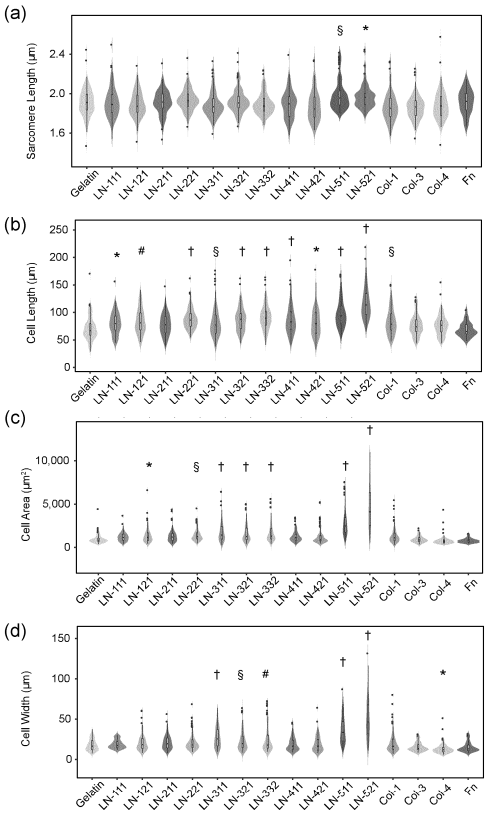
【図７】


Myom2-RFP⁺ Cells (%)
Mean RFP Intensity (a.u.)
Gelatin
LN-111
LN-121
LN-211
LN-221
LN-311
LN-321
LN-332
LN-411
LN-421
LN-511
LN-521
Col-1
Col-3
Col-4
Fn

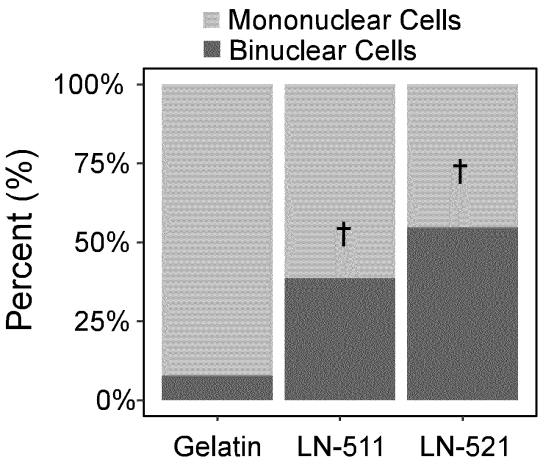
【図８】


Myom2-RFP
α-actinin
DAPI

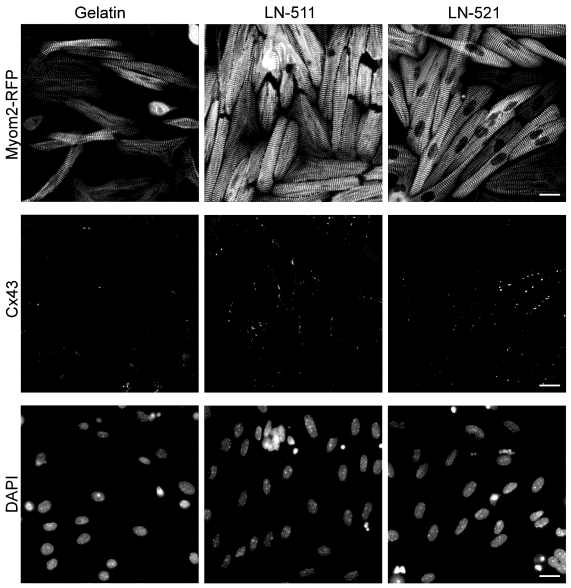
【図９】


(a)
Sarcomere Length (μm)
(b)
Cell Length (μm)
(c)
Cell Area (μm²)
(d)
Cell Width (μm)
Gelatin
LN-111
LN-121
LN-211
LN-221
LN-311
LN-321
LN-332
LN-411
LN-421
LN-511
LN-521
Col-1
Col-3
Col-4
Fn

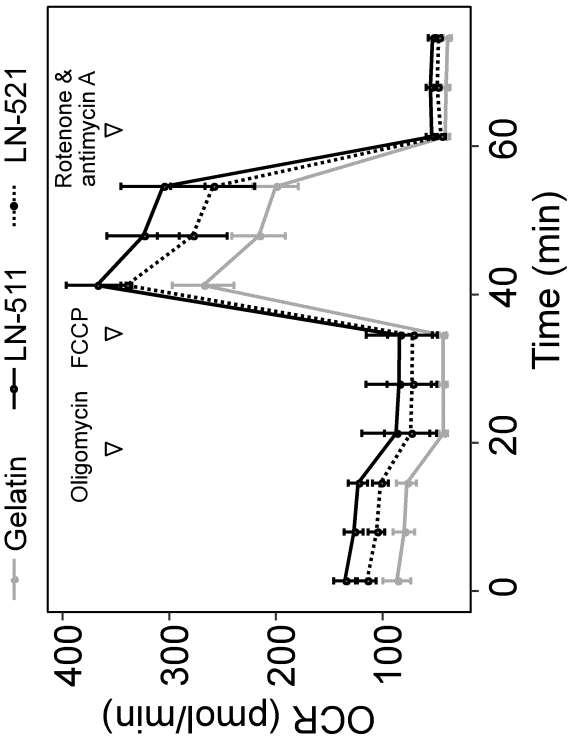
【図１０】


Mononuclear Cells
Binuclear Cells
Percent (%)
100%
75%
50%
25%
0%
Gelatin
LN-511
LN-521

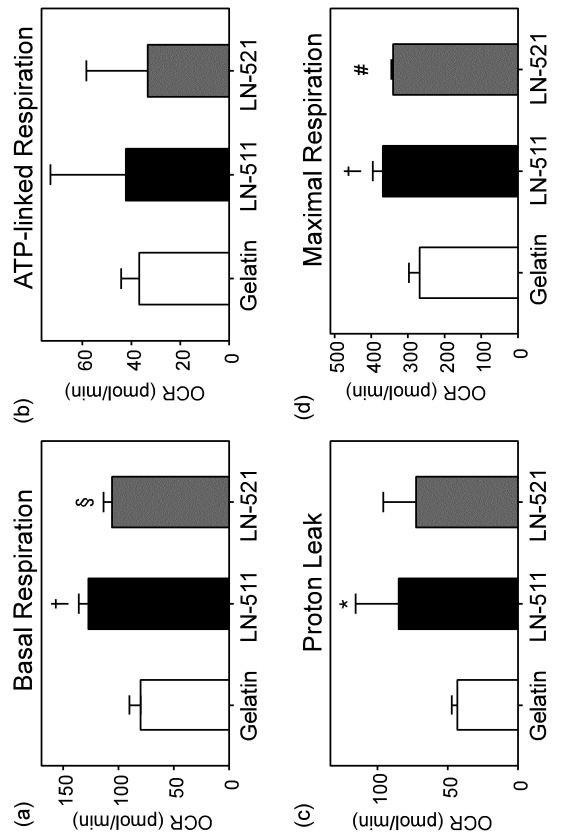
【図１１】



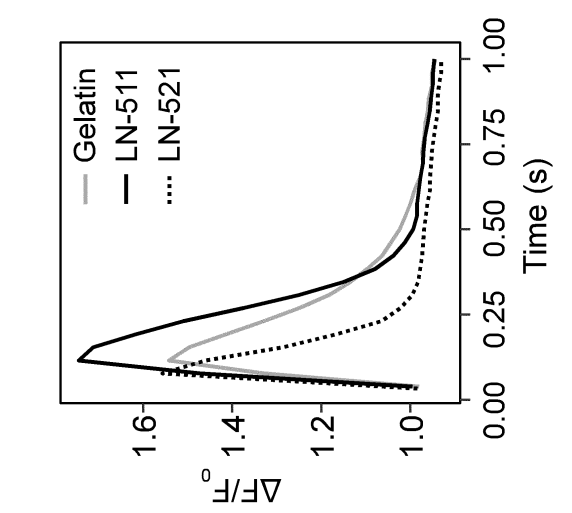
【図１２】



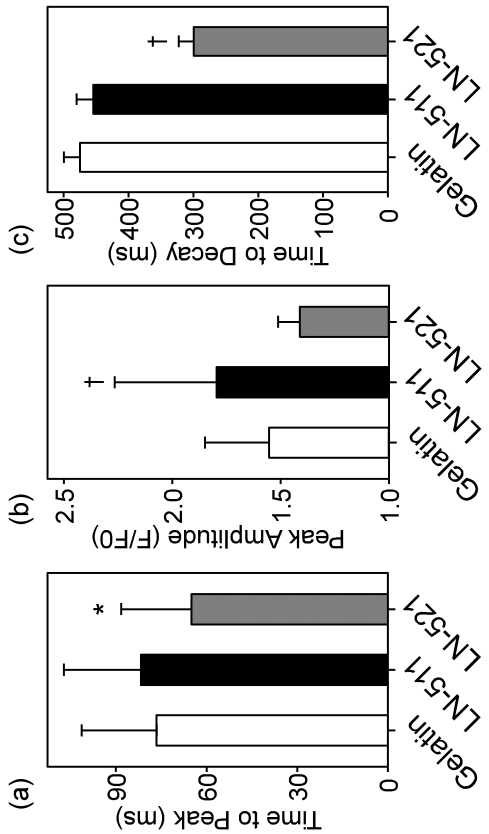
【図１３】



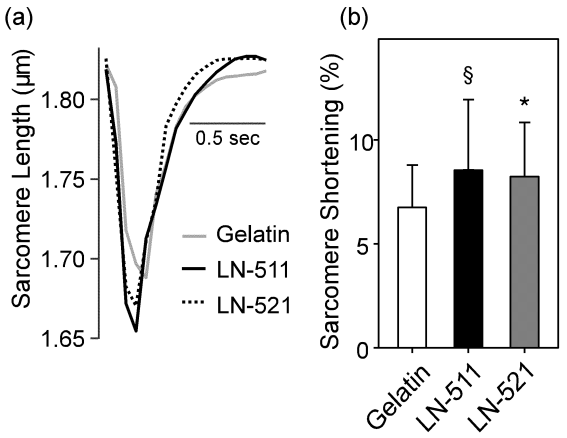
【図１４】



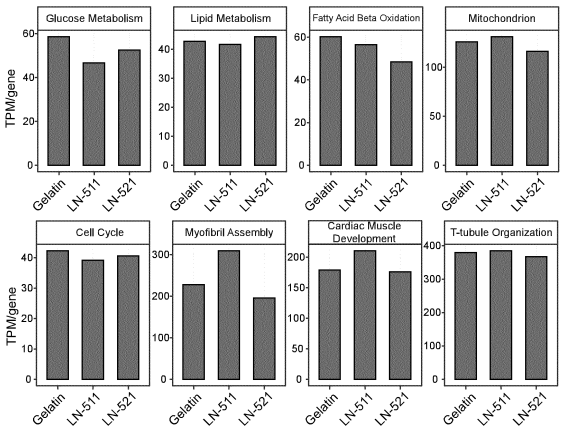
【図１５】



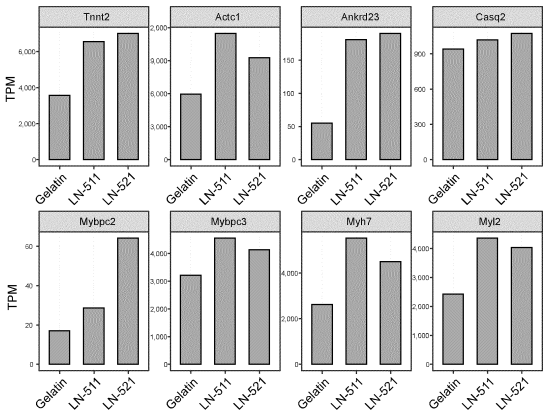
【図１６】



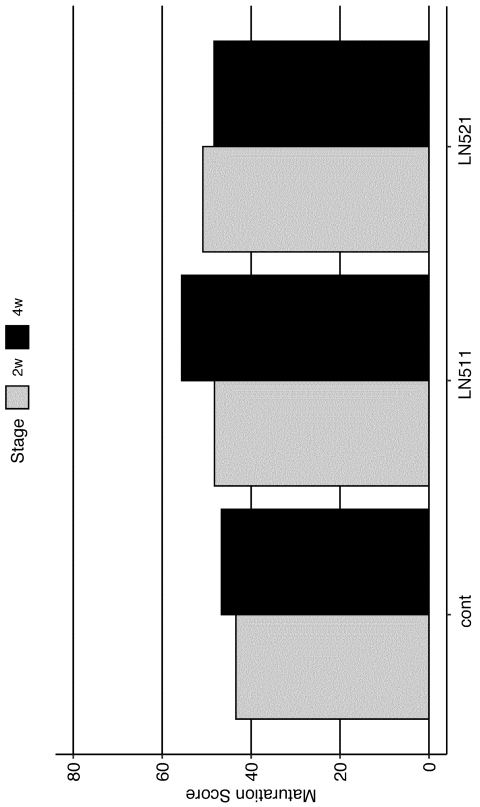
【図１７】



【図１８】



【図１９】



フロントページの続き

」に係る委託研究開発、産業技術力強化法第１７条の適用を受ける特許出願
前置審査

(56)参考文献　米国特許出願公開第２０１６／０１２２７１７（ＵＳ，Ａ１）
国際公開第２０１６／１０４６１４（ＷＯ，Ａ１）
国際公開第２０１８／０３８２４２（ＷＯ，Ａ１）
米国特許出願公開第２０１５／０１６４９５８（ＵＳ，Ａ１）
米国特許出願公開第２０１３／０３３０８２５（ＵＳ，Ａ１）
国際公開第２０１８／１４３３１２（ＷＯ，Ａ１）
国際公開第２０１６／０４３１６８（ＷＯ，Ａ１）
心筋細胞と電気現象｜心臓とはなんだろう（２），看護roo!，2015年，retrieved from the Internet on 2023.11.22, https://www.kango-roo.com/learning/1657/

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　５／００－５／２８
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）