

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2009

課題番号：18390116

研究課題名(和文) ヒト心筋形成物質(因子)の同定ーヒト心筋の再生誘導ー

研究課題名(英文) Identify of human cardiac myogenesis substance (factor)

研究代表者 梅澤 明弘(UMEZAWA AKIHIRO)

国立成育医療センター(研究所)・生殖・細胞医療研究部・部長

研究者番号 70213486

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基盤研究(B)

キーワード：移植・再生医療、循環器・高血圧、液性因子、バイオインフォマティクス

1. 研究計画の概要

ヒト間葉系細胞を、マウス胎児初代心筋培養細胞と共培養すると、自己拍動し心筋特有の活動電位を有する心筋細胞に分化する。再生心筋細胞の細胞源の一つとして骨髄は有名であるが、骨髄に比し本研究で重要な細胞ソースとして考えている子宮内膜・月経血は、若年者から得られ、大量の細胞が得られる点が利点で、心機能を改善できるだけの十分な細胞量を確保できる。また、臍帯血・胎盤は、あらゆる HLA をカバーできる細胞バンクを形成できる可能性がある。しかし心筋への分化誘導率の低い大量の細胞を保存することはコストパフォーマンス的に困難であり心筋誘導率の高い細胞を簡単に選定し濃縮する技術が必須となる。本研究は①様々な臓器由来のヒト間葉系幹細胞株から効率よく多量の分化心筋細胞を獲得する方法の確立、骨髄間葉系細胞を心筋細胞に分化誘導する分泌分子の単離精製と臨床応用を目指した *in vivo* での効果の検討、②心臓幹細胞である心臓 S P 細胞の心筋細胞への分化誘導、③移植組織の血管新生の機序と促進因子の同定を目的とし、研究を遂行する。

本研究は、心筋細胞分化および血管新生誘導因子という安全かつ効率のよい細胞移植治療確立のために欠くことのできない要素の集約的研究である。

2. 研究の進捗状況

ヒト間葉系幹細胞の培養・心筋への分化誘導法の確立および *in vivo* における心筋分化誘導についての検討を重ねた。ヒト由来間葉系幹細胞の採取方法、培養方法の標準化を行っ

た。培養方法については完全ヒト型培養法の確立を目指すとともに、未分化状態での維持法ならびに分化誘導培養法の標準化も行った。これらの培養で維持された細胞について、効率よく心筋細胞に分化させる因子を質量分析、シグナルシークエンストラップ法(SST法)などにより網羅的に分析し複数精製した。さらに高い心筋分化効率を有する間葉系幹細胞株にのみ強発現している遺伝子を MicroArray 法により同定した。成体内のさまざまな臓器由来の間葉系幹細胞を単離し、限界希釈法によりサブクローニング後、得られた各種間葉系幹細胞に細胞寿命の延長に関わる遺伝子を導入、高発現させ、それに伴う細胞の増殖能の増加、寿命の延長を検討した。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

我々は Gene chip の解析を行う事で心筋分化に BMP アンタゴニストが関与している可能性を示唆する事ができた。そこで BMP アンタゴニストを用いた心筋分化誘導実験を胎児性癌細胞(mEC)細胞である P19CL6 を用いてその検討を行った。DMSO と一緒に BMP アンタゴニストを添加することで DMSO 単独の添加よりも高い心筋分化誘導に成功した。BMP アンタゴニストが心筋形成(促進)因子であることを明らかにした。

4. 今後の研究の推進方策

ヒト間葉系幹細胞の培養・心筋への分化誘導法の確立および *in vivo* における心筋分化誘導についての検討を重ねる。今後についても継続して検討に重点を置く。

①ヒト由来間葉系幹細胞の採取方法、培養方法の標準化を行う。培養方法については完全ヒト型培養法の確立を目指すとともに、未分化状態での維持法ならびに分化誘導培養法の標準化も行う。

②これらの培養で維持された細胞について、効率よく心筋細胞に分化させる因子を質量分析、シグナルシーケンストラップ法 (SST法) などにより網羅的に分析し、複数精製する。さらに、高い心筋分化効率を有する間葉系幹細胞株にのみ強発現している遺伝子を MicroArray 法により同定する。

③成体内のさまざまな臓器由来の間葉系幹細胞を単離し、限界希釈法によりサブクロニング後、得られた各種間葉系幹細胞に細胞寿命の延長に関わる遺伝子を導入、高発現させ、それに伴う細胞の増殖能の増加、寿命の延長を検討する。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 25 件)

Kami D, Shiojima I, Makino H, Matsumoto K, Takahashi Y, Ishii R, Naito AT, Toyoda M, Saito H, Watanabe M, Komuro I, Umezawa A. Gremlin enhances the determined path to cardiomyogenesis. PLoS One 3(6):e2407, 2008

[学会発表] (計 件)

なし

[図書] (計 件)

なし

[産業財産権]

なし

[その他]

なし