

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-ヒト心筋の再生誘導-

研究課題名（英文） Identification of human cardiomyogenic 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

研究成果の概要（和文）：

ヒト由来間葉系幹細胞に着目し、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、分化誘導培養法の標準化も検討した。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同定した。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。培養上清中の物質を、心筋細胞への分化誘導能を指標に精製し、質量分析により同定した。UBET細胞より分泌される分子を同定し、P19CL6の心筋細胞分化誘導能を指標に、分子を絞り込んだ。UBET細胞と心筋細胞分化誘導能のない間葉系細胞のDNAchip解析またはサブストラクションを行い、心筋細胞分化誘導因子を特定した。

研究成果の概要（英文）：

The critical event in heart formation is commitment of mesodermal cells to a cardiomyogenic fate and their migration into anterolateral regions of the embryo during gastrulation. In this process, morphogenic movements and cardiac fate determination are regulated by cytokines. These secreted proteins play important roles in induction of cardiac transcription factors and differentiation of cardiomyocytes in amphibians and avians. Cardiomyogenic signals, indeed activate expression of cardiac specific transcriptional factors (Csx/Nkx2.5, Gata4, Mef2c), and these transcriptional factors activate expression of circulating hormones and cardiac specific proteins. Wnt family proteins have also been implicated in embryonic development, and cardiomyogenesis. In *Drosophila*, 'wingless', a homologue of vertebrate Wnt is involved in expression of 'tinman', through 'armadillo', and drives heart development. In vertebrates, however, Wnt1/3a, which activates the canonical Wnt/b-catenin signaling pathway leading to stabilization of b-catenin through inactivation of glycogen synthase kinase-3b, inhibits cardiomyocytic differentiation from cardiac mesoderm. Wnt11 promotes cardiac differentiation via the non-canonical pathway in *Xenopus* and murine embryonic cell lines. The secretion of Wnt inhibitors prevents Wnt3a secreted by the neural tube from inhibiting heart formation. In this study, we performed GeneChip analysis to identify multiple extracellular determinants, and evaluated the statistical significance of differential gene expression by NIA array analysis (<http://lgsun.grc.nia.nih.gov/ANOVA/>), a web-based tool for microarray data analysis. We found that Grem1 enhances the determined path to

cardiomyogenesis, and that inhibition of the BMP signaling pathway is, at least in part, involved in initial determination of Grem1-promoted cardiomyogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2007年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2008年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2009年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医薬薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理

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

1. 研究開始当初の背景

心不全・心筋梗塞の治療法として再生治療が注目されている。骨格筋細胞、骨髄細胞、内皮細胞による細胞移植が臨床試験中であるが、臨床的に十分な数の心筋細胞と血管の両者を再生する方法は確立されていない。細胞移植の際、ES細胞は容易に心筋細胞に分化する(Komuro et al. Proc Natl Acad Sci 1993)が、免疫的拒絶や腫瘍形成の問題がある。骨格筋細胞は心筋ではないため効率の良い収縮は望めない。骨髄単核球細胞、内皮細胞移植は心筋細胞に分化する効率は低く、左室機能の改善は血管新生やアポトーシス抑制効果による。遺伝子導入により細胞寿命を延長したヒト骨髄間葉系細胞はヒト胎児心筋細胞との共培養により心筋細胞に形質転換した(Takeda, Umezawa J Gene Med 2004)。しかし、遺伝子導入やヒト胎児心筋細胞との共培養は臨床において実際的ではない。そこで、間葉系細胞を単独で効率よく心筋細胞に分化させるためには強力な心筋分化誘導因子が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

我々はUBET細胞がES細胞やP19CL6細胞株を高率に心筋細胞に分化させる分泌因子の産生を発見し、その蛋白の一つを同定した。本研究では骨髄間葉系細胞、心筋幹細胞を心筋細胞に分化誘導する因子と、血管新生を促進する因子を単離精製し、非侵襲的な心血管分化誘導療法の確立を目指す。本研究ではUBET細胞から分泌される因子について質量分析、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、骨髄間葉系細胞を効率よく心筋細胞に分化させ複数精製する。臓器由来のヒト間葉系幹細胞株を樹立してin vitroにおいて心筋に分化させ、効率よく多量の分化心筋細胞を獲得する手法を確立する。ヒトを含む動物に存在する幹細胞分画であるside population(SP)細胞を心臓から単離し、心筋細胞に分化させてin vitro心筋幹細胞分化モデルを作成し、分化誘導因子を解析する。血管新生をモニターできるマウスに分化心筋細胞を移植し、心筋再生と血管再生を検証し、心筋移植後の血管再構築を促すサイトカインや増殖因子を同定する。傷害心筋を再生するためには心筋と血管の両者が有機的に再生される必要がある。本研究において、①様々な臓器由来のヒト間葉系幹細胞株から効率よく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SP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する。

3. 研究成果

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。培養方法は完全ヒト型培養法の確立を目指し、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検討した。これらの培養で維持された細胞を、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)などにより分析し、複数精製した。心筋

分化効率を高く有する間葉系幹細胞株にのみ強発現する遺伝子を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、限界希釈法によりサブクローニング後の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、それに伴う細胞増殖能の増加、寿命の延長を検討した。培養上清中の物質を、P19CL6の心筋細胞への分化誘導能を指標に精製し同定した。UBET細胞より分泌される分子を同定し、P19CL6の心筋細胞分化誘導能を指標に、分子を絞り込んだ。UBET細胞と心筋細胞分化誘導能のない間葉系細胞のDNAchip解析またはサブストラクションを行い、心筋細胞分化誘導因子を特定した。

5. 主な発表論文等

(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2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.

Zhu W, Shiojima I, Ito Y, Li Z, Ikeda H, Yoshida M, Naito AT, Nishi J, Ueno H, Umezawa A, Minamino T, Nagai T, Kikuchi A, Asashima M, Komuro I. IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis. **Nature**. 454(7202):345-349, 2008.

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称：心筋細胞分化誘導促進剤及びその使用方法 テルミサルタン、バルサルタンを用いる

発明者：三好俊一郎、梅澤明弘、小川聡

権利者：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

種類：特許

番号：特許公開2009-136209

出願年月日：2007年12月6日

国内外の別：国内

名称：心筋細胞分化誘導促進剤及びその使用方法 ピオグリタゾンを用いる

発明者：三好俊一郎、梅澤明弘、小川聡

権利者：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

種類：特許

番号：特許公開2009-153514

出願年月日：2009年7月16日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.nch.go.jp/reproduction/index.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

秦 順一(HATA JUNICHI)

国立成育医療センター(研究所)・名誉総長
研究者番号:90051614

牧野 初音(MAKIHO HATSUNE)

国立成育医療センター(研究所)・生殖細胞医療研究部・共同研究員

研究者番号:90392498

崔 昌浩(SAI SYOKO)

国立成育医療センター(研究所)・生殖細胞医療研究部・共同研究員

研究者番号:80392497

阿久津 英憲(AKUTSU HIDENORI)

国立成育医療センター(研究所)・生殖細胞医療研究部生殖技術研究室・室長

研究者番号:50347225

那須 道世(NASU MICHIO)

国立成育医療センター(研究所)・生殖細胞医療研究部・共同研究員

研究者番号:80014116

黒田 雅彦(KURODA MASAHIKO)

東京医科大学・病理学研究室・准教授

研究者番号:80251304

(3) 連携研究者

なし