

機関番号：82611

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2010

課題番号：19209047

研究課題名（和文）成体由来幹細胞からの三次元心筋組織作製法の開発と臨床応用

研究課題名（英文）Development of 3D culture using cardiac stem cells derived from adult heart and its clinical application

研究代表者

川口奈奈子（KAWAGUCHI NANAKO）

（独）国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 遺伝子疾患治療研究部 科研費研究員

研究者番号：10200700

研究成果の概要（和文）：成体心臓由来幹細胞（ラット）を用いて、梗塞が起こった心臓に移植するための3次元培養法の確立を目指した。心臓由来幹細胞は、c-kit陽性細胞から得た。同じ方法を用いて採取されたc-kit陽性細胞であっても、長期培養により、異なった遺伝子発現パターンが観察された。GATA4を高発現する細胞は、心筋細胞に分化しやすい傾向が見られ、また、共存培養した心筋細胞の寿命を延ばす効果が見られたので、再生医療に適する細胞であると考えられた。さらに、TGF- β スーパーファミリーが筋細胞への分化に関与することを示した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to establish 3D culture for transplantation to the infarcted heart. Cardiac stem cells obtained as c-kit positive cells from adult rat hearts were used as a cell source. Even if we use the same method to obtain c-kit positive cells, different genes expression pattern was observed after the long-term culture. Among the various cardiac stem cells (CSCs), GATA4 high-expressing CSCs showed more potential to differentiate into cardiac myocytes than GATA4 low-expressing cells *in vitro*. Furthermore, these GATA4 high CSCs had more survival effect on the co-cultured cardiac myocytes derived from adult rat heart than GATA4 low-expressing CSCs. Therefore, GATA4 high CSCs are the appropriate cell source for regenerative medicine for heart failure. We also showed that TGF- β superfamily associates with myogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	31,400,000	9,420,000	40,820,000
2008年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
総計	39,800,000	11,940,000	51,740,000

研究分野：

科研費の分科・細目：胸部外科学

キーワード：心臓 幹細胞 c-kit GATA4 3次元培養

1. 研究開始当初の背景

2003年頃、成体心臓にも幹細胞が存在し、心臓の機能の回復に貢献している可能性がいくつかの研究室から報告された。心臓の機能の低下による、心筋梗塞、心不全は、現在

最も深刻な死因の一つである。重症心不全に対する有効な治療法は心臓移植しかないが、免疫系の拒絶反応が問題となる。そこで、自家細胞由来の幹細胞を利用した移植治療法の開発が注目された。

2. 研究の目的

報告された成体心臓由来幹細胞のうち、最も心臓細胞に効率よく分化すると期待された c-kit 抗体による細胞分離に着目した。c-kit 陽性細胞を長期培養して、未分化安定性、および、心臓細胞への（平滑筋、心筋、血管内皮）分化能について検討する。さらに、心筋細胞の分化能が高い細胞を特定する。一方、幹細胞を植え込んだ3次元培養法を確立する。

3. 研究の方法

c-kit 陽性細胞を11回以上採取し、採取した細胞を増殖培地で40代以上培養した。この時、RT-PCRにより、未分化に関わる遺伝子発現、および、心臓細胞分化に関わる遺伝子発現について検討した。さらに、心筋に発現することで知られる、転写因子GATA4の発現量と心筋細胞への分化能の関係を検討した。また、得られた細胞をコラーゲンスキャフォールドに植え込んで3次元培養組織を作製することを試みた。

4. 研究成果

長期培養した c-kit 陽性細胞は、心臓細胞への分化のみならず、脂肪細胞、骨格筋細胞など、中胚葉系の細胞にも分化した (Miyamoto *et al.*, 2010)。GATA4 の発現が高い細胞は、低い細胞より、心筋細胞への分化能が高かった (Miyamoto *et al.*, 2010, Kawaguchi *et al.*, 2010)。GATA4 の発現が高い細胞を成体心臓由来心筋細胞と共培養すると、心筋細胞の寿命が長くなる効果もみられた。この効果は、IGF-1 を介する反応であることが、ウェスタンブロット、および、IGF-1 受容体に対する抗体添加により阻害されることから明らかになった (Kawaguchi *et al.*, 2010)。したがって、GATA4 の発現が高い細胞を再生医療に用いることが望ましいと考えられた。

心臓由来幹細胞を用いた、3次元培養法も確立した (Hosseinkhani *et al.*, 2010)。

一方、左心房培養細胞から採取した c-kit 陽性細胞をセルローズ培地 (メソカルト培地) で培養することにより、少数の拍動する心筋細胞が得られた (Hasan *et al.*, 2010)。未分化細胞と分化細胞を比較したマイクロアレイ解析の結果から、TGF- β スーパーファミリーが分化を制御することが明らかとなった。さらに、*noggin* をメソカルト培地に加えることで、多くの拍動する心筋細胞を得ることができた (Kawaguchi *et al.*, 2010)。

今後、最適な幹細胞と TGF- β スーパーファミリーを活用して有効な移植材料を作製すること、およびそれを移植する技術の確立が課題として残った。

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11件)

- ① Machida M, Takagaki Y, Matsuoka R and Kawaguchi N Proteomic comparison of floating spherical aggregates and dish-attached cells of cardiac stem cells. *International Journal of Cardiology* (in press) 査読有
- ② Kawaguchi N, Smith A, Waring C, Hasan K, Miyamoto S, Matsuoka R and Ellison GM Gata4^{high} CSCs foster cardiac myocyte survival. *PLoS ONE*, 5(12) e14297. (in press) 査読有
- ③ Kawaguchi N, Yamaguchi M, Nakao R, Ogawa D and Matsuoka R (2010) TGF- β Superfamily regulates a switch that mediates differentiation either into adipocytes or myocytes in left atrium derived pluripotent cells (LA-PCs). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 396,615-625. 査読有
- ④ Hasan, MK, Komoike Y, Tsunesumi S, Nagao H, Nakao R, Matsuoka R, and Kawaguchi N (2010) Myogenic differentiation in atrium-derived adult cardiac pluripotent cells and the transcriptional regulation of GATA4 and myogenin on ANP promoter *Genes to Cells*, (15)439-453. 査読有
- ⑤ Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Hattori S, Matsuoka R and Kawaguchi N (2010) Micro and nano-scale *in vitro* 3D culture system for cardiac stem cells. *Journal of biomedical materials research, Part A* 94A, 1-8. 査読有
- ⑥ Miyamoto S, Kawaguchi N, Ellison G, Matsuoka R, Shin'oka T and Kurosawa H (2010) Characterization of long-term Cultured Cardiac Stem Cells (CSCs) Derived from Adult Rat Hearts *Stem Cells and Development* 19, 1, 105-116. 査読有
- ⑦ 宮本真嘉, 松村剛毅, 市原有起, 川口奈奈子, 八木寿人, 松岡瑠美子, 黒澤博身 (2008) 遺伝子を導入した骨髄幹細胞の心筋内移植による心筋症治療法の開発. (財)日本心臓血圧研究振興会(平成十九年度研究業績集) pp 13-6. 査読無
- ⑧ Kawaguchi N, Miyamoto S, Ellison GM, Matsuoka R, Shin'oka T (2007) Characterization of c-kit-positive enriched cells isolated from the adult rat heart. In: Nadal-Ginard B, Takakura K (Eds.) Future aspects of

Medical Science and Education:
Proceedings of the 2nd IREIIMS Open
Symposium "Challenge of Integrated
Medical Sciences", IREIIMS, Tokyo,
pp.75-76. 査読無

- ⑨ 新岡俊治、松村剛毅、宮本真嘉、市原有起、保々恭子、松岡瑠美子、八木寿人、川口奈奈子、黒澤博身 (2007) 遺伝子を導入した骨髄幹細胞の心筋内移植による心筋症治療法の開発。(財)日本心臓血圧研究振興会(平成十八年度研究業績集) pp 1-4. 査読無
- ⑩ Kawaguchi N Differentiation and Survival Regulators on Adult Cardiac Derived Stem Cells.(*Vitamins and Hormones, Stem cell regulator*; Vol.86, invited) 査読無
- ⑪ Kawaguchi N Stem cells for cardiac regeneration and possible roles of the Transforming growth factor (TGF)- β family (*Biomolecular Concepts*), invited 査読有

[学会発表] (計 20 件)

シンポジウム、招待講演

- ① Kawaguchi N, Smith AJ, Waring CD, Ellison GM. c-kit^{pos} GATA-4 high Rat Cardiac Stem Cells Foster Adult Cardiomyocyte Survival Through IGF-1 Paracrine Signalling. Keystone Symposia, Stem Cells in Development, Tissue Homeostasis and Disease, , 2011-2-1 Santa Fe, New Mexico, USA
- ② 川口奈奈子 成体心臓由来幹細胞を用いた統合再生研究 Final IREIIMS Open Symposium, 2010-2-8 東京女子医科大学。
- ③ 川口奈奈子 成体心臓由来幹細胞を対象とした統合再生研究 2009-12-13. 東京(学士会館)。
- ⑤ 川口奈奈子 幹細胞の治療への応用における細胞生物学者からみた現状と問題および将来への期待、ニッピマトリクス研究所講演 2008-9-25. ニッピマトリクス研究所。
- ⑥ Mitsuyo Machida¹, Yohtaroh Takagaki¹, Shinka Miyamoto^{1, 2}, Rumiko Matsuoka¹, Nanako Kawaguchi¹ Proteome Analysis of Cardiosphere from Adult Rat Hearts: Comparison of Spherical and Adherent State of Cardiac Stem Cells 成体ラット心臓由来幹細胞のプロテオーム解析: 培養条件により誘導された球状塊 cardiosphere 及び非球状接着状態の比較 2008 日本分子生物学会、春季シンポジウム。札幌。
- ⑦ Kawaguchi N Characterization of cardiac stem cells derived from adult

rat heart. 3rd IREIIMS Symposium. 2007. 東京女子医科大学。

- ⑧ Kawaguchi N, Miyamoto S, Matsuoka R and Shinoka T Characterization of cultured c-kit positive cells derived from adult rat heart 2nd IREIIMS Symposium. 2006. 東京女子医科大学。学会発表
- ⑨ Kawaguchi N (2010) TGF- β superfamily regulates a switch that mediates differentiation of bulk-cultured adult rat left atrium-derived pluripotent cells (LA-BC) into either adipocytes or myocytes 日本分子生物学会, 2010-12-8. 神戸。
- ⑩ Kawaguchi N (2010) Differentiation of adult rat left atrium-derived pluripotent cells into adipocytes or myocytes is controlled by a switch regulated by the TGF- β superfamily. American Society for Cell Biology, 2010-12-13. Philadelphia, USA.
- ⑪ Nakao R, Kamrul Hasan, Matsuoka R and Kawaguchi N (2009) Comparing the transcriptional profiles of undifferentiated left atrial pluripotent cells. 日本分子生物学会、2009-12-12. 横浜。
- ⑫ Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Nakao R, Miyamoto S, Hattori S, Matsuoka R and Kawaguchi N (2009) Effect of Micro and Nano-Scale 3D Culture System on Cardiac Stem Cells 日本分子生物学会、2009-12-12. 横浜。
- ⑬ Kawaguchi N, Nakao R and Matsuoka R (2009) Identification of the genes involved in signal transduction during myogenesis by using LA-PCs. American Society for Cell Biology, 2009-12-6. San Diego, USA.
- ⑭ Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Hattori S, Matsuoka R and Kawaguchi N Development of 3D culture system for implanting cardiac stem cells from adult rat hearts by combinational technology of 3D tissue engineered scaffold perfusion bioreactor. International Society for Stem Cell Research, 2009-7-9. Barcelona, Spain
- ⑮ Kawaguchi N, Miyamoto S, Ellison GM, Hasan MK, Matsuoka R. Characterization of cultured c-kit positive cardiac stem cells derived from adult. American Society for Cell Biology, 2008-12-17. San Francisco, USA.

- ⑩ M. Kamrul Hasan¹, Shinka Miyamoto², Rumiko Matsuoka¹ and Nanako Kawaguchi¹ Synergistic Activation of Atrial Natriuretic Peptide (ANP) Promoter by GATA4 and Myogenin American Society for Cell Biology, 2008-12-17. San Francisco, USA.
- ⑪ 川口奈奈子、宮本真嘉、Kamrul Hasan, Georgina Ellison, 松岡瑠美子 ラット心臓 由来幹細胞の心筋細胞への延命効果に関する研究, 日本分子生物学会, 2008-12-11. 神戸。
- ⑫ M. Kamrul Hasan, Shinka Myamoto, Rumiko Matsuoka and Nanako Kawaguchi. Characterization of Left Atrium Derived Cardiac Stem Cells. 日本分子生物学会、2008-12-11. 神戸。
- ⑬ 川口 奈奈子、宮本真嘉、成体ラット心臓由来幹細胞の再生医療への応用 日本女性科学者の会, 2008-11-16. 東京 (学士会館)。
- ⑭ Nanako Kawaguchi¹ Mitsuyo Machida¹, Rumiko Matsuoka¹, Yohtaroh Takagaki^{1*}, Proteomic analysis of cardiac stem cells derived from adult rat hearts: comparison of the sphere and adherent states of a cardiosphere forming cell clone by protein profiling. American Heart Association, 2008-11-9, New Orleans, USA.
- 21 川口奈奈子、宮本真嘉、Ellison, G., 松村剛毅、松岡瑠美子 (2007) 成体ラット心臓由来幹細胞の性質決定と心筋細胞への分化、日本分子生物学会、2007。横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川口奈奈子 (KAWAGUCHI NANAOKO)

(独) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 遺伝子疾患治療研究部 (科研費研究員)

研究者番号 : 10200700

(2) 研究分担者

斎藤 聡 (SAITOH SATOSHI)

東京女子医科大学 医学部 (講師)

研究者番号 : 60246551

松村剛毅 (MATSUMURA GOKI)

東京女子医科大学 医学部 (助教)

研究者番号 : 20297463