

平成21年 5月24日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790547
 研究課題名（和文）
 ヒト胚性幹細胞における心筋分化細胞の単離技術の開発と再生医療への応用
 研究課題名（英文） A novel biotechnology of gene therapy and human embryonic stem cells for regenerative medicine
 研究代表者
 高橋 知之（TAKAHASHI TOMOYUKI）
 久留米大学・高次脳疾患研究所・准教授
 研究者番号：20332687

研究成果の概要：これまで申請者は、胚性幹（ES）細胞による難治性循環器疾患の再生医療技術開発を目指したマウス ES 細胞における心筋分化誘導法(Kawai-T, Takahashi-T, et al. '04 Circ J.)、ならびに ES 細胞由来心筋分化細胞の同定・単離技術の開発(Adenoviral conditional targeting 法)を行ってきた(Takahashi-T, et al. '06 Mol. Ther.)。本研究課題では、マウス ES 細胞研究において培ってきた分化誘導法や目的細胞の同定・単離技術をヒト ES 細胞において応用する事によって、主にアデノウイルスベクターを利用したヒト ES 細胞による再生医療技術開発を行なった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心臓病態学、ヒト ES 細胞、心筋発生・分化、再生療法

1. 研究開始当初の背景

多能性を有するヒト胚性幹（ES）細胞は、再生医療を担う細胞ソースの一つとして世界中で盛んに研究が行なわれている。しかしながら、既に、マウス ES 細胞による心筋疾患モデル動物に対する ES 細胞移植治療法の開発は試みられており心機能の改善が報告されているものの、未だヒト ES 細胞による研究は海外でも少数で、臨床応用可能なヒト ES 細胞による効率良い心筋分化誘導法や分化誘導後得られた心筋細胞の移植療法

の確立が切望されている。とりわけ根幹の技術とも言えるヒト ES 細胞に対する遺伝子組み換え技術は、これまで染色体内に取り込まれて発癌等の危険性に曝されるレンチウイルスベクター（LV）を利用した方法が主であることから、安全性の高い遺伝子導入技術の開発は急務である。

2. 研究の目的

申請者は、ヒト ES 細胞による難治性循環器疾患の再生医療技術開発を目指したマウ

ス ES 細胞における心筋分化誘導法(Kawai-T, Takahashi-T, et al. '04 Circ J.)、ならびに ES 細胞由来心筋分化細胞の同定・単離技術の開発 (Adenoviral conditional targeting (ACT) 法) を行ってきた (Takahashi-T, et al. '06 Mol. Ther.)。

本研究は、マウス ES 細胞研究において培ってきた分化誘導法や目的細胞の同定・単離技術をヒト ES 細胞において応用する事によって、ヒト ES 細胞による再生医療技術開発を目的としている。

3. 研究の方法

(1) ヒト ES 細胞における心筋分化誘導法の開発

マウス ES 細胞研究において、心筋分化誘導効率を飛躍的に上昇させるために申請者らが進めてきた以下の方法をヒト ES 細胞に応用し、ヒト ES 細胞における心筋分化誘導効率を検討した。

- ① 胚様体 (embryoid body:EB) 作製過程における増殖因子添加による心筋分化誘導方法の開発
- ② 心筋分化促進支持細胞のスクリーニングと共培養 (胚様体作製を介さない方法) による心筋分化誘導法の開発

(2) 遺伝子治療ベクターによるヒト ES 細胞における遺伝子改変技術の確立

アデノウイルスベクター (Ad) は細胞に感染後もエピゾーマル状態が保たれ、染色体に組み込まれる事無く比較的長い期間、遺伝子の導入とその発現が維持される安全性の高いベクターである。そこで、ヒト ES 細胞に Ad を応用するために以下のような検討を行った。

- ① CMV、RSV、ニワトリ β -actin (CA) それぞれのプロモーターによって Enhanced green fluorescence protein (eGFP) を発現する Ad. CMV-EGFP, Ad. RSV-EGFP, Ad. CA-EGFP の Ad による遺伝子導入効率の比較評価
- ② ファイバー変異型 Ad (Ad. CA-EGFP/F-RGD) とコンベンショナルな Ad (Ad. CA-EGFP) による遺伝子導入効率の比較検討
- ③ Ad によるフィーダー細胞除去後の浮遊系における遺伝子導入法の確立

(3) 単離ヒト ES 細胞由来心筋細胞による移植再生療法の開発

上述の研究によって、ヒト ES 細胞による心筋分化誘導法の開発、ならびに心筋分化細胞の単離法の応用を進めてきたが、現時点では高純度で、大量の移植可能なヒト ES 細胞由来心筋細胞を得るまでには至っていない。

しかしながら今後、ヒト ES 細胞由来心筋

細胞に応用可能な細胞移植法と遺伝子治療の融合による心疾患再建療法確立を目的とした予備実験の一環として、以下の心筋症や心筋梗塞モデル動物における治療メカニズムの解析研究についても進めた。

- ① 心筋症・心筋梗塞モデル動物における Hepatocyte growth factor (HGF) 遺伝子治療の評価
- ② 可溶性 Fas 遺伝子治療ならびに Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) 投与を組み合わせた心筋梗塞治療メカニズムの解析

4. 研究成果

(1) ヒト・マウス ES 細胞における新たな心筋分化誘導法の開発

まず始めに、マウス ES 細胞研究で開発してきた EBs 形成を介した心筋分化誘導法をヒト ES 細胞に応用するために、ヒト ES 細胞を個々の細胞に分散して浮遊系の培養を行った。その結果、ヒト ES 細胞では安定した EB 形成が困難で、心筋分化がほとんど認められないことが明らかとなった。これは一つ一つの細胞に分散することでヒト ES 細胞の生存率の低下が起るため、次に、数十個の細胞塊による浮遊培養を行うこととした。しかし、僅かに EB 形成が認められる程度で、安定した心筋分化誘導はほとんど認められなかった。

そこで、血球系細胞の分化誘導法として用いられる支持細胞との共培養による分化誘導を試みた。スクリーニングのためにマウス ES 細胞を数種類の支持細胞と共培養したところ、ある間葉系細胞 X と培養することで高率な心筋分化誘導が可能であることを見いだした。また更に、分化誘導の促進因子をスクリーニングするために、これまでに分化促進が報告されている増殖因子や化学物質を共培養系に添加したところ、 α MHC 遺伝子の発現を 1.5 倍以上促進する因子 Y の同定に成功した。この共培養法をヒト ES 細胞で検討したところ、心筋分化コロニーは 10%程度とマウス ES 細胞ほど高率には分化誘導されないものの、分化誘導が可能であることが示された。

(2) ヒト ES 細胞における遺伝子導入方法の開発

マウス ES 細胞に効率的、安全に遺伝子導入可能な Ad によるヒト ES 細胞に対する遺伝子導入効率の検討を行った。それぞれ CMV、RSV、CA プロモーターによって eGFP を発現する Ad. CMV-EGFP、Ad. RSV-EGFP、Ad. CA-EGFP、更には細胞への感染効率の増加を期待したファイバー変異型 Ad. CA-EGFP/F-RGD による遺伝子導入効率を評価した。その結果、Ad. CMV-EGFP、Ad. RSV-EGFP では eGFP 発現が

認められなかったのに対して、CA プロモーターを利用したコンベンショナル Ad.CA-EGFP とファイバー変異型 Ad.CA-EGFP/F-RGD で、eGFP の強い発現が認められ、 3×10^7 pfu/ml で約 90% の導入効率が得られた。また、 3×10^8 pfu/ml 以上でも細胞障害は認められず、遺伝子導入後もヒト ES 細胞は Oct3/4 などの未分化マーカーを発現していることから、Ad によってヒト ES 細胞に対する安全で高い効率の遺伝子導入が可能であることが明らかとなった。

一方で、CMV や RSV などウイルス由来の遺伝子プロモーターはヒト ES 細胞内では機能しないこと、更にヒト ES 細胞は Ad の感染に必要な Ad レセプターの CAR を発現しており、ファイバー変異型にすることで、かえってフィーダー細胞（ヒト ES 細胞用支持細胞）への非特異的な吸着・遺伝子導入が増加して、Ad の消耗による導入効率の低下が起こることが明らかとなった。また、フィーダー細胞によるウイルスの吸着・消耗を防ぐために、浮遊状態でヒト ES 細胞に対する Ad 遺伝子導入法の検討を行い、浮遊系での遺伝子導入法の確立に成功した。

(3) 単離ヒト ES 細胞由来心筋細胞による移植再生療法の開発

まず、doxorubicin によって誘発した心筋症モデルマウスに対して HGF 遺伝子治療を行なった結果、HGF 遺伝子治療はマウス心筋の筋繊維の破壊、線維化が抑え、血管新生とともに心機能の回復が認められた。また、冠動脈再還流による心筋梗塞モデルウサギに対して HGF 遺伝子を導入したところ、心筋細胞のアポトーシスを抑制する事で梗塞領域や更に線維化領域を減少させて、心機能を回復できる事が示された。

一方、可溶性 Fas 遺伝子治療と G-CSF を組み合わせた結果、心筋梗塞後の梗塞領域のアポトーシス細胞が減少し、線維化が抑制される事で心機能を維持し、血管新生や α -SMA 陽性細胞の増殖が認められた。この α -SMA 陽性細胞増殖は G-CSF の投与によるものと考えられ、可溶性 Fas 遺伝子によって損傷領域の拡大を防ぐ一方で、損傷した虚血領域でも細胞の増殖・生存環境が整えられる事が示された。

以上の結果から、本研究のスクリーニングによって得られた間葉系細胞 X とヒト・マウス ES 細胞を共培養することによって、心筋分化を簡便に誘導できることが明らかとなった。また、これまで多くの場合、ヒト ES 細胞の遺伝子導入には LV が利用されてきたが、Ad によって安全で効率良い遺伝子導入が可能となることが示された。更に、ヒト ES 細胞に対する遺伝子導入には発現プロモーターの選択が重要であることが明らか

かとなった。また更に、これまで共同で進めてきた遺伝子治療研究による成果は、治療効果のみならず、損傷領域の線維化を防ぎ、移植細胞の生着環境を整える働きも期待される。従って、本研究成果は国内外で進められるヒト ES 細胞や iPS 細胞研究において、Ad を用いた ACT 法の開発の基盤となり、再生医療技術の発展における重要な研究と位置づけられる。

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 4 件) [全て査読あり]

- ① Okada H., Takemura G., Kosai K.I., Tsujimoto A., Esaki M., Takahashi T., Nagano S., Kanamori H., Miyata S., Li Y., Ohno T., Maruyama R., Ogino A., Li L., Nakagawa M., Nagashima K., Fujiwara T., Fujiwara H., Minatoguchi S.
Combined therapy with cardioprotective cytokine administration and anti-apoptotic gene transfer in postinfarction heart failure.
Am J Physiol: Heart and Circulatory Physiology 296(3):H616-626 (2009)
- ② Kondo T., Takemura G., Kosai K., Ohno T., Takahashi T., Esaki M., Goto K., Maruyama R., Murata I., Minatoguchi S., Fujiwara T., Fujiwara H.
Application of an adenoviral vector encoding soluble transforming growth factor-beta type II receptor to the treatment of diabetic nephropathy in mice
Clin Exp Pharmacol Physiol 35(11), 1288-1293 (2008)
- ③ Esaki M., Takemura G., Kosai K., Takahashi T., Miyata S., Li L., Goto K., Maruyama R., Okada H., Kanamori H., Ogino A., Ushikoshi H., Minatoguchi S., Fujiwara T., Fujiwara H.

Treatment with an adenoviral vector encoding hepatocyte growth factor mitigates established cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiomyopathy

Am J Physiol: Heart and Circulatory Physiology 294(2), H1048-1057 (2008)

- ④ Chen XH., Minatogichi S., Kosai K., Yuge K., Takahashi T., Arai M., Wang N., Misao Y., Lu. C., Onogi H., Kobayashi H., Yasuda S., Ezaki M., Ushikoshi H., Takemura G., Fujiwara T., Fujiwara H. In vivo hepatocyte growth factor gene transfer reduces myocardial ischemia-reperfusion injury through its multiple actions. *J Card Fail.* 13(10), 874-883 (2007)

[学会発表] (計2件)

- ① 須田憲治、安川秀雄、高橋知之、岡村尚昌、西野裕、横山隆人、工藤嘉公、石井治佳、家村素史、松石豊次郎 「川崎病急性期における流血中の樹状細胞の動態 Significant decrease of circulating myeloid dendritic cells in acute phase of Kawasaki disease」第28回日本川崎病研究会(札幌)平成20年10月17-18日 札幌医科大学
- ② Murofushi Y., Kamizono J., Khai NC., Takahashi T., Komiya S., and Kosai K. "Conditional replicating adenovirus regulated by SURVIVIN and CER promoters exerted more strict cancer specificity and potent anti-cancer effect" Japan Society of Gene Therapy The 13th Annual Meeting 2007 28-30, June 2007, International Conference Hall (Aichi Cancer Center)

[その他]
ホームページ等
<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/brain/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 知之 (TAKAHASHI TOMOYUKI)
久留米大学・高次脳疾患研究所・准教授
研究者番号：20332687