

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790549
 研究課題名（和文）誘導多能性幹細胞由来の心筋細胞分化誘導法の確立および心不全治療への応用
 研究課題名（英文）Establishment of differentiation method of iPS cell derived cardiomyocytes

研究代表者
 大野 洋平（OHNO YOHEI）
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：80383884

研究成果の概要（和文）：我々は様々な iPS 細胞ラインより心筋細胞を分化誘導し、iPS 細胞ラインにより心筋分化効率が異なることを解析した。さらにそれらを純化した(未分化細胞や非心筋細胞を除去)後、iPS 細胞樹立に用いた導入遺伝子の発現を iPS 細胞ライン毎に調べたところ、iPS 細胞ラインにより導入遺伝子の発現レベルが異なっており、導入遺伝子の発現が高いままのものは心筋分化効率も悪く、心筋分化に対して抵抗性を示していることが確認された。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the difference of cardiomyocyte differentiation derived from mouse iPS cells. RT-PCR analysis of the purified iPS-derived cardiomyocytes revealed that iPS-derived cardiomyocytes with higher expression level of residual exogenous transgene had lower beating efficiency compared with that of iPS-derived cardiomyocytes with lower expression level of residual exogenous transgene. Higher expression level of exogenous transgene may have contributed to lower incidence of beating colonies, preventing differentiation to cardiomyocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：iPS 細胞、患者特異的 iPS 細胞、iPS 細胞由来心筋細胞、iPS 細胞由来心筋の分化誘導効率

1．研究開始当初の背景

ES 細胞とほぼ同等の能力を有する iPS 細胞の誕生により、患者由来の細胞移植療法が現実的な目標となってきた。患者特異的 iPS 細胞由来心筋の再生医療の実現に向けて、iPS 細胞由来心筋の特性、安全性を確認する必要がある。

2．研究の目的

我々は ES 細胞を安定して効率よく心筋細胞へ分化させる誘導方法を確立しており、本研究では、その手法を応用し、様々な iPS 細胞ラインの多能性幹細胞としての生物学的性質の違い、各細胞ラインの心筋細胞への分化効率の違いとその要因を検討し、iPS 細胞由来心筋細胞が細胞移植源として適しているかを「安全性」と「質」という二つの側面から評価する予定である。各 iPS 細胞ラインの未分化マーカーの発現量の違いを RT-PCR で確認、心筋細胞へ分化するまで経時的に未分化マーカー・中胚葉・心筋構造蛋白・転写因子などを QT-PCR で確認する。また、各 iPS 細胞ライン毎に電気生理学的解析を行い、作業心筋(心房心室筋)、特殊心筋(刺激伝道系)の割合をパッチクランプ法にて解析する。

3．研究の方法

(1) iPS 細胞をフィーダー細胞(MEF)上で培養し、以前から知られている胚性幹細胞から心筋細胞への効率的分化誘導方法として知られている Hanging drop 法による心筋細胞分化誘導効率を検討する。Hanging drop 法とは、ペトリディッシュのふたに 500cell/20 μ l のドロップを作製

し、数日培養を継続し、Embryoid body(胚様体)の形成を確認する。その後、浮遊培養の系に移し、24well の cell culture dish に 4 個/well の割合で播種する。Dish に接着し、広がった細胞より beating する細胞が出現し、カウントを行う。

- (2) iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導および効率化が安定した後、分化誘導後の心筋細胞の表現系の解析を行う。具体的には、RT-PCR、免疫染色にて各種遺伝子発現を確認する。
- (3) さらに、iPS 細胞由来の心筋細胞の電気生理学的特性を検討するため、パッチクランプ法を用いて活動電位記録を行う。

4．研究成果

(1) iPS細胞を用いてhanging drop法による心筋細胞分化誘導効率を検討した。iPS細胞として、第一世代マウスiPS細胞(Fbx-iPS細胞)および第二世代マウスiPS細胞(Nanog-iPS細胞)を用いた結果、Nanog-iPS細胞はFbx-iPS細胞に比べて心筋への分化がより早く、より効率がいいことが判明した(図1)。さらにNanog-iPS細胞間においても心筋への分化誘導効率には差が認められた。Nanog-iPS細胞ラインのうち最も心筋分化誘導効率が優れたものはES細胞とほぼ同等であった。すなわち、今後我々がiPS細胞を移植治療などへの応用を目指した場合、各iPS細胞毎に心筋への分化誘導効率を確認し、良質な細胞ラインを選択する必要があることが示唆された。

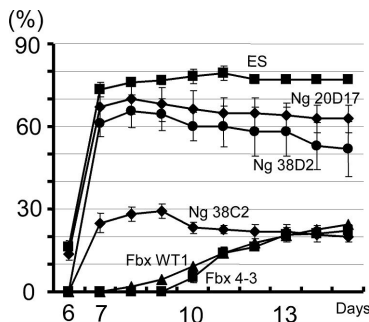


図1: 各iPS細胞ライン別の心筋細胞分化効率
 ES: 胚性幹細胞
 Ng: Ng-iPS細胞の3ライン
 Fbx: Fbx-iPS細胞の2ライン

(2) iPS細胞由来心筋細胞の機能解析を行った。免疫染色ではFbx-iPS、Nanog-iPS、ES細胞由来心筋細胞を比較したが、いずれも心筋特異的蛋白である α -actinin、MHC、ANPおよび心筋特異的転写因子であるNkx2.5、GATA4などの発現が確認された。ただし、QT-PCRにおいて各種遺伝子の発現パターンを確認したところ、Nanog-iPSおよびES細胞由来心筋はほぼ同様の遺伝子発現パターンを示したが、Fbx-iPS細胞由来心筋は遺伝子発現が弱く、かつ発現のピークに至るまでの時間が遅かった(図2)。

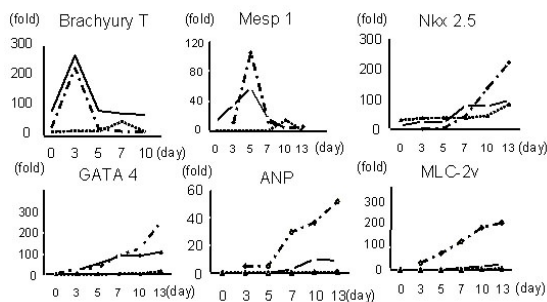


図2: 各iPS細胞ライン毎の心筋細胞分化効率の違い
 - - - - - ES細胞
 ————— Ng-iPS細胞
 Fbx-iPS細胞

(3) iPS細胞由来心筋細胞の電気生理学的特性を検討するため、パッチクランプ法を用いて活動電位記録を行った。ES細胞由来心筋細胞

と同様に、ペースメーカー様、心房筋様、心室筋様の活動電位が記録された。

(4) iPS細胞由来心筋細胞を純化した後、iPS細胞作成時に使用された4つの外来遺伝子の発現レベルを比較したところ、Nanog-iPS細胞由来心筋細胞に比べ、Fbx-iPS細胞由来心筋細胞の方が外来遺伝子の発現が高く、心筋細胞への分化抵抗性の一因と考えられた(図3)。

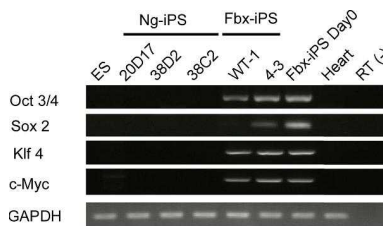


図3: 純化したiPS由来心筋における導入遺伝子(4因子)の発現

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0件)

[学会発表](計3件)

Yohei Ohno, Shinsuke Yuasa, Toru Egashira, Tomohisa Seki, Hisayuki Hashimoto, Shugo Toyama, Takahide Arai, Tomofumi Tanaka, Fumiyuki Hattori, Kojiro Yae, Mitsushige Murata, Satoshi Ogawa, Shinya Yamanaka, Keiichi Fukuda. Molecular characterization of induced pluripotent stem (iPS) cell-derived cardiomyocytes. 2010年3月6日日本循環器学会(京都)

Yohei Ohno, Shinsuke Yuasa, Takeshi Onizuka, Toru Egashira, Kenichiro Shimoji, Sung Han Yoon, Takahide Arai, Chen Hao, Tomofumi Tanaka, Fumiyuki Hattori, Toshimi Kageyama, Satoshi Ogawa, Shinya

Yamanaka, Keiichi Fukuda. Molecular characterization, safety and feasibility of induced pluripotent stem (iPS) cell-derived cardiomyocytes for heart regenerative therapy. 2009年3月22日
日本循環器学会(大阪)

Yohei Ohno, Shinsuke Yuasa, Toru Egashira, Tomohisa Seki, Hisayuki Hashimoto, Shugo Toyama, Sung Han Yoon, Takahide Arai, Chen Hao, Tomofumi Tanaka, Fumiyuki Hattori, Kojiro Yae, Mitsushige Murata, Satoshi Ogawa. Molecular Characterization of Induced Pluripotent Stem (iPS) Cell-Derived Cardiomyocytes, 2009年11月16日 American Heart Association (USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

大野 洋平 (OHNO YOHEI)

慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：80383884

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし