

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03761

研究課題名(和文) ヒト口腔内間葉ミューズ細胞から分化誘導した心臓原基を用いた新規再生医療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel method of regenerative medicine using cardiac anlage differentiated from human oral mesenchymal muse cells

研究代表者

鈴木 保之 (Suzuki, Yasuyuki)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：60344595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：移植された分化誘導心筋細胞が長期間機能を維持したとの報告はない。その原因を鈴木らは心臓を構成する多種類の細胞を分化誘導して得る方法がないことに起因していると考え、多能性幹細胞が多いヒト歯髄幹細胞から心原基を得ることが必須であると考えた。まず胚子成長因子(EmbGF)を作製し、これを用いて歯髄幹細胞を天蓋培養して胚盤胞に似た胚様体を作製した。この胚様体をEmbGFで還流培養し、心拍動を有する胚子様構造体を作製した。この拍動する心原基を採取し、心筋細胞、心弁膜、刺激伝導系を得た。刺激伝導系細胞は培養下に容易に神経束様の構造を形成した。心筋細胞は培養下に増殖し心筋ネットワークを形成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

あらゆる種類の心機能不全に陥った患者を再生医療で救済するための全く新しい移植細胞採取法を開発した。すなわち万能細胞が多い歯髄幹細胞を天蓋培養して胚様体を作製し、これを成育させて胚子様構造体を作製して、そこから心臓を構成する細胞をone set有する心原基を採取して再生医療に供するものである。心原基を再生医療の細胞源にすればあらゆる心疾患に対処できる新規心臓再生医療の創成となり、その社会的貢献は計り知れない。またHLAホモドナーの歯髄あるいはUDC化したiPS細胞から胚子様構造体を分化生育すれば、他家移植の再生医療が可能になりその社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：There are no reports of transplanted differentiated induced cardiomyocytes maintaining their function for a long period of time. The applicants considered that this was due to the lack of a method to obtain the many types of cells that make up the heart by differentiation induction, and considered it essential to obtain cardiomyoblasts from human dental pulp stem cells, which are rich in pluripotent stem cells. First, embryonic growth factor (EmbGF) was prepared, which was used to produce embryoid bodies resembling blastocysts by canopy culture of dental pulp stem cells. These embryoid bodies were reflux-cultured with EmbGF to produce embryoid-like structures with beating hearts. The beating cardiac primordium was harvested to obtain cardiomyocytes, cardiac valve leaflets and stimulatory conduction system. The stimulo-conducting system cells readily formed nerve bundle-like structures in culture. Cardiomyocytes proliferated in culture and formed a myocardial network.

研究分野：心原基を分化誘導する医学再生医療

キーワード：歯髄幹細胞 胚様体 胚子様構造体 心原基

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) iPS 細胞、ES 細胞あるいは組織幹細胞から目的の細胞を分化誘導し、疾患モデル動物に移植する報告は多数存在する。しかし機能不全に陥っている心臓は多種類の細胞で構成されているため分化誘導した心筋細胞を移植しても長期にわたり十分な機能回復が得られない。この問題を抜本的に解決するため腫瘍形成の心配がない組織幹細胞でありかつ万能細胞が多い歯髄幹細胞から心原基を有する胚子様構造体を分化生育させようと考えた。
- (2) 発生学で受精卵が卵管を子宮に向かって移動しながら胚盤胞になり、着床して胚子に生育する。この現象を培養下に再現しようと考え、卵管上皮細胞や子宮内膜細胞が産生する生理活性物質を念頭に培養液の作製を試みた。我々はすでにマウスの受精卵をもっともよく生育させるフィーダー細胞 (SKG-II) とそこから無血清培養液で分裂増殖する細胞 (SKG-IISF) を樹立している。この細胞が産生する生理活性物質を参考にして新しい分化誘導成育培地を作成しようと考えた。

2. 研究の目的

分化誘導した細胞 (組織) を移植後、長期間正常な心機能を維持できる再生医療を提供することを目的とする。すなわち歯髄幹細胞から胚子様構造体を成育させ、そこから心原基を採取して再生医療に供する全く新しい再生医療法を創成する。これに成功したら他家移植可能な HLA ホモドナーの歯髄幹細胞、さらに UDC 化した iPS 細胞から胚子様構造体を成育させ、心原基を採取しオーダーメイドの再生医療を創成する。

3. 研究の方法

- (1) 受精卵が卵管を移動しながら胚盤胞になり、子宮内膜に着床して胚子が形成されることを参考にして、卵管上皮細胞から産生される生理活性物質とマウスの受精卵をもっともよく成育させるヒト子宮頸部上皮由来の SKG-IISF 細胞 (無血清培地成育株細胞) の培養上清 (conditioned medium (CM)) を ELISA 法で assay し、そこに含有される生理活性物質を明らかにした。その中から 13 種の生理活性物質を選別し EmbGF を作製した。
- (2) 歯髄細胞を 1000 個/10cm シャーレに播種し、最も大きな colony を採取し、歯髄幹細胞とした (Human Cell, Takahashi H, et al. 2017)。この細胞を 1×10^5 細胞/75 μ l (EmbGF 含有 DMEM/F12) をシャーレの蓋を用いて天蓋培養して胚様体を作製、実体顕微鏡下に形の良い胚様体を選別し、これを Rose's chamber にいれ EmbGF 添加培養液で約 1 か月間還流培養して心拍動を伴う胚子様構造体を作製する。実体顕微鏡下に心拍動する心原基を採取し、この心原基から心筋細胞、プルキンユ細胞、心弁膜を採取し培養する。これらの細胞は CryoScarless あるいは CellBanker に入れ、液体窒素内に保存する。

4. 研究成果

- 1) 歯髄幹細胞から胚様体を作製し、これを成育させて胚子様構造体に成育させるための EmbGF (13 種の生理活性物質を含有) を作製した (特許準備中)。
- 2) 歯髄細胞から薄撒き法で得た歯髄幹細胞は節のある突起を持つ紡錘形細胞であった (図

1)。歯髄幹細胞を天蓋培養(図2)して作製した胚様体は胚盤胞胚に類似していた(図3)。外細胞塊にあたる部分は単層の上皮様構造で、内細胞塊にあたる部分は天蓋培養中に重力で沈殿した細胞塊によって構成されていた。実体顕微鏡下に形の良い胚様体を選び、Rose's chamberで約1か月間還流培養(図4)して胚子様構造体を作製した(図5)。還流培養中、胚様体あるいは成育過程の胚子様構造体がRose's chamberに接着すると扁平な胚子様構造体になり、心拍動は見られない。そのため胚子様構造体の成育状態に応じて還流培養液の速度を調節した。胚子様構造体中には様々な器官・臓器の原基が存在したが、この中から拍動(80回/分)する心原基を採取した。胚子様構造体の作製法は特許準備中である。胚子様構造体中の心原基(図6a)は1心房1心室で大きな弁膜構造が観察された(HE染色を図6bに示す)。心室の心筋層は厚く、心房の心筋層はそれに比べ薄かった。心房には太い血管が存在した。心筋層を消化酵素で細胞解離し静置培養し、心筋細胞と神経様プルキンヨ細胞を分離採取した。心筋細胞はシートを形成しやすい細胞であった(Actinin染色を図7に示す)。プルキンヨ細胞は細胞策を形成しこの細胞策から複数の枝を出して成長した(位相差顕微鏡像、図8)。心筋細胞の増殖は極めて遅いため、培養液に様々な生理活性物質を添加し専用の心筋細胞増殖培養液を作製した(特許準備中)。実験計画では心機能不全動物の心筋に移植する予定であったが、移植実験に使用できる満足するモデル動物の作製に成功していない。HLA-Aホモドナーの歯肉間葉幹細胞から胚子様構造体の作製に成功しているが、その作製率は低いため現在EmbGFの改良、還流培養法の改良を続けている。

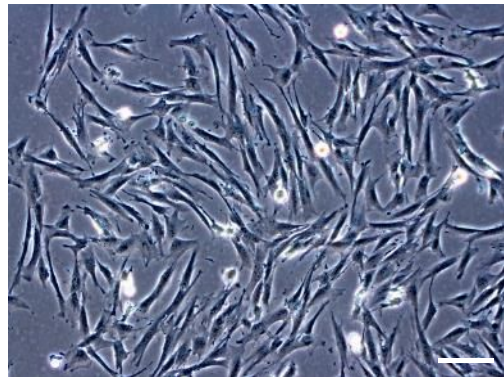


図1 歯髄幹細胞

Hanging drop method

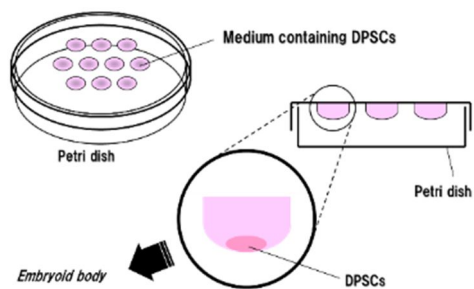


図2 天蓋培養

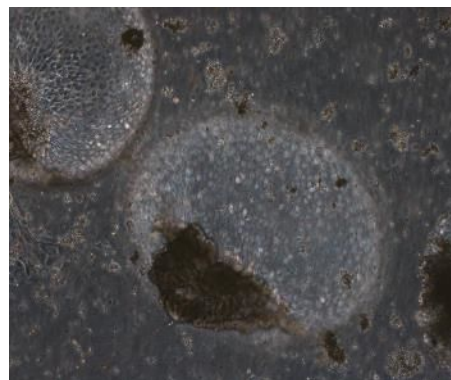


図3 胚様体

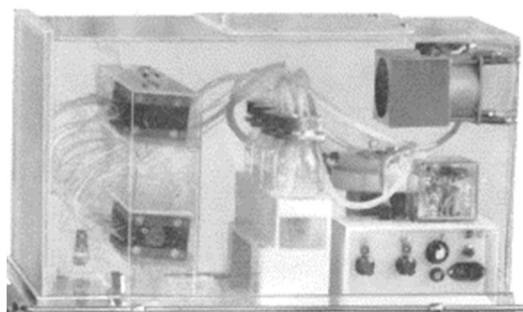


図4 還流培養装置



図5 胚子様構造体

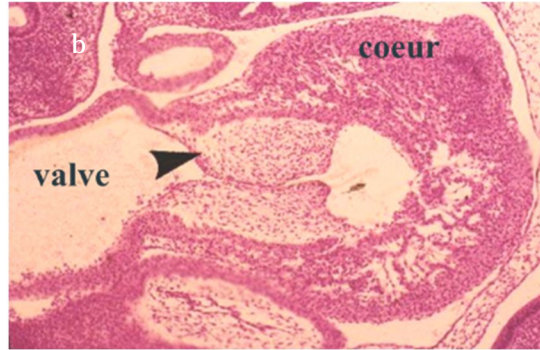


図6 胚子様構造物の心原基 a. 実体顕微鏡像 矢印：拍動する心原基, b, HE 染色

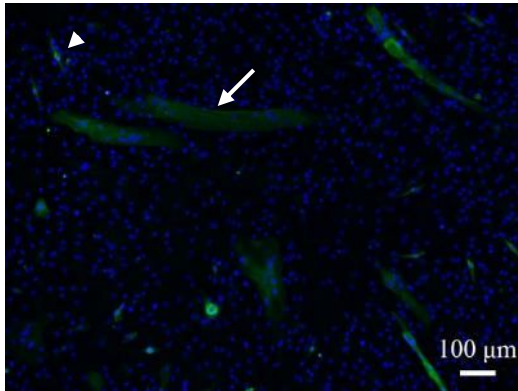


図7 -アクチニン染色(緑), 核(青)
心筋細胞は集合し太い細胞束を形成(矢印), 心筋細胞(矢頭)

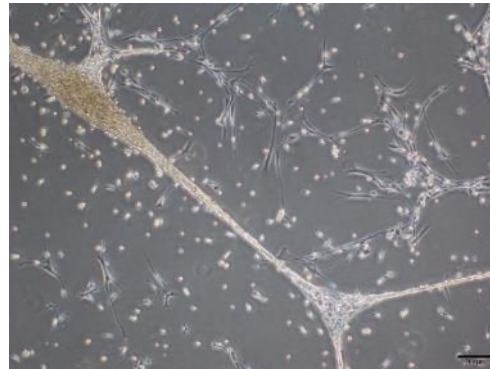


図8 プルキンユ細胞が作る細胞索

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石川 博 (Ishikawa Hiroshi) (30089784)	筑波大学・医学医療系・研究員 (12102)	
研究分担者	丸島 愛樹 (Marushima Aiki) (40722525)	筑波大学・医学医療系・講師 (12102)	
研究分担者	松丸 祐司 (Matsumaru Yuji) (70323300)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	
研究分担者	松村 明 (Matsumura Akira) (90241819)	筑波大学・医学医療系・客員教授 (12102)	
研究分担者	渡邊 美穂 (Watanabe Miho) (20845317)	大阪市立大学・大学院医学研究科・特任助教 (24402)	
研究分担者	豊村 順子 (Toyomura Junko) (80645630)	筑波大学・医学医療系・研究員 (12102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	大山 晃弘 (Ohyama Akihiro) (90538232)	筑波大学・医学医療系・研究員 (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関