

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月5日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2012

課題番号：21790373

研究課題名（和文） ヒト心筋分化誘導因子の同定 - 誘導メカニズムの解明 -

研究課題名（英文） Definition of human cardiomyogenic differentiation factor

研究代表者

上 大介 (KAMI DAISUKE)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：80415588

研究成果の概要（和文）：

心筋細胞への分化誘導は細胞の分化状態、発現遺伝子、細胞外環境に大きく影響することが本事業より明らかとなった。本知見は今後の心筋細胞誘導の足がかりとして重要な役割を担い、新たな研究の礎になりえる。

研究成果の概要（英文）：

Differentiation into cardiomyocytes is depended to cell differentiated state, expression genes, and extracellular environment. This idea could play important role in next step for cardiomyogenic differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	900,000	189,000	1,089,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：人体病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：分化誘導、心筋細胞、液性因子、遺伝子導入、心筋分化、間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

これまでに細胞移植に用いられる細胞について、様々な検討がなされてきたが、十分な治療効果の期待できるものはなかった。例えば、「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」「骨格筋芽細胞は心筋ではないため効率の良い収縮は望めない」「骨髄単核球細胞は心筋細胞に分化する効率が低い」また、「遺伝子導入により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する (Takeda, Umezawa J

Gene Med 2004) が、遺伝子導入やヒト胎児心筋細胞との共培養は臨床における細胞移植治療では実際的ではない」といったものである。これらの検討を踏まえ、申請者は、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いう着想に至った。さらに、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同定することで、心筋細胞及び血管分化誘導療法の確立が可能であると考えた。

2. 研究の目的

心不全・心筋梗塞の新しい治療法として再生医療が注目されている。現在、骨髄細胞等を用いた細胞移植がすでに臨床応用されているが、十分な数の心筋細胞および血管を再生するには至っておらず、その治療効果は満足いくものではない。そこで、本研究では心臓の再生医療に用いる細胞の心筋分化および血管再生について検討し、心機能改善効果の高い移植に適した細胞を探索する。

3. 研究の方法

心筋分化誘導に適した細胞、さらには導入すべき遺伝子は共培養法による基礎的知見とマイクロアレイ解析にて選定し、その遺伝子のクローニングを行い、レトロウィルスベクターに組み込んだ。更に目的細胞に遺伝子を複数導入し、分化誘導因子の探索をおこなった。

4. 研究成果

解析の結果、子宮内膜由来細胞、心臓幹細胞を目的細胞とし、これらの細胞に作製した遺伝子（合計 32 ベクター作製）を導入した（表 1）。

EGFP	MESP1
TBX5	NFIC
GATA4	NFIB
MEF2C	NR3C1
HAND1	HOD
HAND2	SOX9
L-MYC	T
TBX20	SOX7
PRDM16	ELK3
PGC-1a	LASS4
NKX2-5	TSC22
HES1	E2F6
MITF	RARB
BAF60C	ANKRD1
ISL1	ACTL6A
CDKN2C	GLIS1

表 1 レトロウィルスベクター一覧

さらに導入後の解析を容易にするために、aMHC promoter GFP マウスのマウス胎児性線維芽細胞 (MEF) を調整し、これらの遺伝子を導入した。この結果、複数の因子の組合せにて心筋関連遺伝子の発現が上昇する組合せも存在したが、再現性が低く、再度、検証し直すことにした。その後、Gata4,

Mef2c, Tbx5 といった遺伝子の有効性が報告されたため、これらの遺伝子の導入を試みたが、再現性できなかった。そこで心筋幹細胞にてこれらの遺伝子の導入を試みた。この細胞は心臓の組織から樹立が可能な細胞で、京都府立医科大学を中心とした臨床試験にも利用されている細胞である。東京都健康長寿医療センター (TMIG) にてインフォームド・コンセント済みの患者様より、心臓組織の一部を頂き、細胞を樹立し、その評価を行ったところ、京都府立医科大学 (KPUM) とほぼ同等の特性を示す細胞の樹立に成功した (図 1、表 2)。

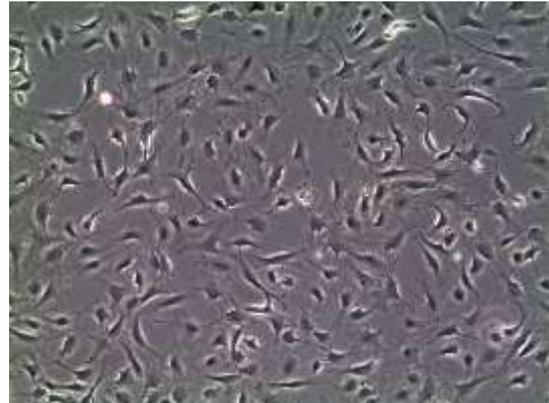


図 1 心臓幹細胞

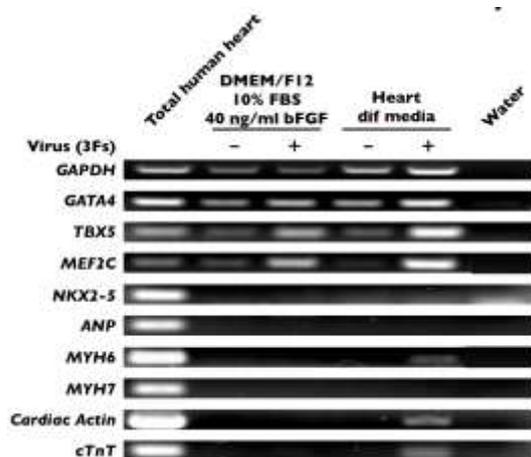
	KPUM	TMIG
Derived from	Infant (Outflow tract, OFT)	Elderly (Right auricle)
Maximum Passage #	12	6-8
RT-PCR (P3-4)	OCT4 + SOX2 +/- cMYC + KLF4 + REX1 + ABCG2 + NKx2-5 - GATA4 +	OCT4 + SOX2 +/- cMYC + KLF4 + REX1 + ABCG2 + NKx2-5 - GATA4 +

表 2 樹立した心臓幹細胞の比較

そこでこの心臓幹細胞に先ほどの 3 遺伝子の導入を試みたが、心筋関連遺伝子は誘導されなかった。そこで培養条件について検討したところ、心筋分化誘導培地 (H dif medium, 組成: DMEM/F12, 10% FBS, 1% ITS-A, 10 nM Dexamethasone) にて遺伝子を導入した

ところ、誘導 10 日目にて心筋関連遺伝子の発現が上昇することが明らかとなった(図 2)。

図 2 遺伝子導入と心筋分化誘導培地による心筋分化誘導



このように心筋分化誘導には分化誘導に適した細胞、誘導に関与する遺伝子の導入、分化誘導に適した培地(細胞外環境)が重要であることが明らかとなった。

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 4 件) (査読あり)

1. Furuya M, Tanaka R, Miyagi E, Kami D, Nagahama K, Miyagi Y, Nagashima Y, Hirahara F, Inayama Y, Aoki I. Impaired CXCL4 expression in tumor-associated macrophages (TAMs) of ovarian cancers arising in endometriosis. *Cancer Biol Ther.* 2012 Jun 1;13(8):671-680. Epub 2012 Jun 1.
2. Furuya M, Okuda M, Usui H, Takenouchi T, Kami D, Nozawa A, Shozu M, Umezawa A, Takahashi T, Aoki I. Expression of angiotensin II receptor-like 1 in the placentas of pregnancy-induced hypertension. *Int J Gynecol Pathol.* 2012 May;31(3):227-235.
3. Kami D, Ishii R, Toyoda M, Makino H, Gojo S, Ishii T, Umezawa A. Placenta to Cartilage: Direct conversion of human placenta to chondrocytes with transformation by defined factors. *Mol Biol Cell.* 2012 Sep;23(18):3511-21. doi: 10.1091/mbc.E11-10-0869. Epub 2012 Jul 25.

4. Kimura M, Toyoda M, Gojo S, Itakura Y, Kami D, Miyoshi S, Kyo S, Ono M, Umezawa A. Amniotic membrane-derived mesenchymal stromal cell transplantation. *J Stemcells & Regenerative Med.* Vol8 No.3, 2012 Oct 19, 8 (3), 171-180

[学会発表] (計 7 件)

1. Daisuke Kami, Masashi Toyoda, Atsushi Kishida, Osam Mazda, Akihiro Umezawa, Masatoshi Watanabe, Hiroaki Matsubara, Satoshi Gojo. Efficient Transfection method using the Magnetic nanoparticles and Episomal vector. 9th International Conference on the Scientific and Clinical Use of Magnetic Carriers. University of Minnesota. 2012
2. 上大介, 豊田雅士, 板倉陽子, 松原弘明, 梅澤明弘, 五條理志 ヒト右心耳由来心筋幹細胞の遺伝子導入による心筋分化誘導 第 11 回日本再生医療学会総会 横浜 2012
3. 上大介, 高橋慎, 豊田雅士, 松原弘明, 関澤隆一, 渡邊昌俊, 梅澤明弘, 五條理志 iPS 細胞の早期・効率的取得を目指したキャピラリー等電点電気泳動法の開発 第 11 回日本再生医療学会総会 横浜 2012
4. Daisuke Kami, Masashi Toyoda, Mayu Yamazaki-Inoue, Naofumi Takehara, Takehiro Ogata, Hiroaki Matsubara, Akihiro Umezawa, Satoshi Gojo. CONSTRUCTION OF LARGE AMOUNTS CULTURE SYSTEM BY AN AUTOMATED CELL PROCESSING MACHINE FOR THE CELL TRANSPLANTATION. International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting. Yokohama 2012
5. Daisuke Kami, Makoto Takahashi, Masashi Toyoda, Ryuichi Sekizawa, Hiroaki Matsubara, Akihiro Umezawa, Satoshi Gojo. BASIC RESEARCH OF THE IMMUNO ASSAY BY THE CAPILLARY ISOELECTRIC FOCUSING FOR EFFICIENT ACQUISITION OF THE IPS CELL. International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting. Yokohama 2012
6. Daisuke Kami, Masashi Toyoda, Atsushi Kishida, Osam Mazda, Hiroaki

Matsubara, Akihiro Umezawa, Satoshi Gojo.
DEVELOPMENT OF HIGH EFFICIENT
GENE DELIVERY SYSTEM USING
EPISOMAL VECTOR AND MAGNETIC
NANOPARTICLES FOR PRODUCTION
OF IPSCS. International Society for Stem
Cell Research 10th Annual Meeting.
Yokohama 2012

7. Daisuke Kami, Ryuga Ishii, Masashi
Toyoda, Hatsune Makino, Satoshi Gojo,
Akihiro Umezawa. PLACENTA TO
CARTILAGE: DIRECT CONVERSION
OF HUMAN PLACENTA TO
CHONDROCYTES WITH
TRANSFORMATION BY DEFINED
FACTORS. ISSCR-Roddenberry
International Symposium on Cellular
Reprogramming. GLADSTONE
INSTITUTES, San Francisco. 2012.

〔図書〕（計 0 件）

該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

該当なし

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上 大介 (Kami Daisuke)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：80415588

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし