

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659597

研究課題名(和文) 移植用自己拍動心筋細胞作成のための心筋分化用基材の開発

研究課題名(英文) Development of artificial niche matrices for cardiac differentiation of stem cells

研究代表者

中谷 武嗣 (NAKATANI, Takeshi)

独立行政法人国立循環器病研究センター・病院・部長

研究者番号：60155752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：幹細胞移植による心疾患治療は、終末医療としての体内埋込み型補助人工心臓に代わる根治的治療法として重要であるが、拍動する心筋細胞の入手は容易でない。間葉系幹細胞から自立拍動する心筋細胞を得ることに成功したがその効率も極めて低い。そこで、様々な組成および力学特性を有する人工細胞外マトリックスニッチェ上で、iPS細胞および新生ラット心筋細胞を培養し、心筋分化、拍動関連タンパク質発現、拍動開始、拍動継続期間、与えるニッチェの影響を解明した。それぞれのステップにおいて、異なった培養環境が最適であること、さらに未分化維持における有用な培養環境が存在することも示唆される結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Stem cell-based myocardial regeneration has been emerged as alternative strategy for the heart transplantation or destination therapy using left ventricular assist system (LVAS). Especially self-beating cardiomyocytes are promising cells, but effective protocols to prepare the mature cardiomyocytes from various stem cells have not been clarified yet. The purpose of this article is find out the effect of stem cell culture niche (ECM proteins and substrate elasticities) on the cardiac differentiation, beating induction, and beating duration separately by using iPS cells (iPSs) and neonatal cardiomyocytes (NCMs). The cardiac differentiation step was greatly enhanced on Col-1-gel but the beating-induction step (α -MHC, TnT1, TnT2 expression) was effective on FN-culture dishes. The beating-duration step, which is assessed by counting the number of beating colonies of NCMs, preferred Col-1-gel. We also found the effective surface for keeping the undifferentiated stages of iPS cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：人工臓器学 心筋梗塞

1. 研究開始当初の背景

生体を構成している細胞は、特異的な環境からの刺激を受けることにより、適切なタイミング・部位にて幹細胞から様々な機能細胞へと分化する。胚性幹細胞 (ES 細胞) または間葉系幹細胞、造血系幹細胞などを移植する再生医療法が試みられ、心筋組織再生においても細胞シートを移植による優れた臨床成果が報告されている。しかしながら、幹細胞移植後の心筋細胞への分化効率は極めて低いため、あらかじめ、自律拍動する心筋細胞を作製したのちに移植する戦略が望ましいと考えている。我々は、懸濁分化誘導方法にて間葉系幹細胞から自律拍動心筋細胞を得ることに成功し、その効率は、培養基材表面の組成に著しい影響を与えることを予備的に見出した。つまり、培養基材表面にコートされた ECM タンパク質 (型コラーゲン、フィブロネクチン、ゼラチン など) の最適化により拍動する心筋細胞への分化が制御できることを示しているが、そのメカニズムの詳細は未だ不明である。そこで、幹細胞の培養基材と心筋細胞分化 (および成熟化) の相関を詳細に検討する必要があると考えた。本研究では、インテグリンを介して情報伝達に関与していると考えられる ECM タンパク質の種類に加えて、細胞培養基材表面のマトリクスタンパク質の力学特性によるメカノシグナルについても併せて検討する必要があった。

2. 研究の目的

拍動心筋細胞分化において、幹細胞は 3 つの大きなプロセスを経る。第 1 は心筋細胞分化ステップであり、心臓分化マーカー遺伝子、GATA 結合タンパク質 4 (GATA4)、筋細胞特異的エンハンサー因子 2D (MEF2D) などを発現する。第 2 のステップは拍動誘導ステップであり、心臓収縮関連タンパク質、 β -ミオシン重鎖 (β -MHC)、トロポニン C タイプ-1 (TnC1)、トロポニン T タイプ-2 (TnT2) を発現する。 β -MHC は主要な収縮タンパク質であり、TnC1、TnT2 はそれぞれ Ca^{2+} 結合性サブユニットとトロポニン複合体のトロポニン結合性サブユニットである。また GATA4 と MEF2D が β -MHC と TnT の発現制御に関する知られている。第 3 は自己拍動ステップである。これらのステップにおいて、細胞の微小環境 (ニッチ) はとても重要な役割を担っている。報告されている。また近年、力学的因子も注目され、成体心筋に類似した弾性の基質上での新生児心筋細胞 (NCMs) の拍動数増加や筋節発達、また心臓発生過程での心筋組織弾性率の経時的な増加が報告されている。

そこで、iPS 細胞の拍動心筋分化に対する培養基質の ECM および弾力成分の影響を、心筋分化、拍動誘導、拍動維持の 3 ステップ別々に評価することを目的とした。培養基質として、コラーゲン (Col-I)、ゼラチン (Gel)、

ファイブロネクチン (FN) を各々固定した 9、20、180kPa の弾性率を有するポリアクリルアミド水ゲル (HG) および 2GPa のポリスチレン培養皿 (TCPS) を用いた。また心臓分化効率は、iPS 細胞の心臓分化遺伝子の GATA4 と MEF2D の発現レベルで評価した。拍動誘導-効率は、新生児心筋細胞の収縮タンパク質の β -MHC、TnC1 および TnT2 の遺伝子発現レベルで評価した。さら拍動維持に対する影響は、新生児心筋細胞の拍動心筋細胞の経時的変化で評価した。

3. 研究の方法

(1) 培養基盤の作製

アミノシラン化カバーガラス上でポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド濃度 (v/v%) / ビスアクリルアミド濃度 (v/v%) : 5/0.03、7.5/0.3、10/0.3) を作製した。原子間力顕微鏡 (AFM) にて測定した弾性率は 9、20、180kPa であった。次にゲル表面に 1mM Sulfo-SANPAH を滴下し、UV 照射後に 0.2 mg/ml のコラーゲン、ゼラチン、ファイブロネクチン溶液をゲル表面に滴下し、4 日 1 晩反応させタンパクを固定化した。

(2) 細胞

【iPSs】マウス iPS-MEF-Ng-178B-5 (理研バイオリソースセンター) を用いた。未分化 iPS 細胞は SNL 細胞上で 15% FBS、0.1 μ M 2-メルカプトエタノール (2-ME)、0.1mM Non-Essential Amino Acids、1000 units/ml 白血病阻止因子を含む DMEM 培養中で培養した。心筋分化誘導培養液には、10% FBS、0.05mM (2-ME)、10ng/ml トリコスタチンを含む β -MEM 培養液を用いた。

【Nn】新生児心筋細胞は、3 日齢のラットの心臓から分離し、10% FBS、1% DMSO を含む β -MEM 培地中で培養した。

(3) 細胞機能評価

各遺伝子の発現は、SYBRGreen 方法を用いて ABI リアルタイム PCR システムで測定した。また拍動細胞数はカルシウムインジケターである Rhod4 を用いて拍動細胞を染色し測定した。

4. 研究成果

(1) iPS 細胞の心筋分化誘導

iPS 細胞の心筋分化への培養基質の影響を調べるため、分化誘導後 14 日目の心筋分化マーカー (GATA4 および MEF2D) の遺伝子発現レベルを評価した。両遺伝子とも類似した発現傾向を示し、ECM-TCPS 上で上昇し、ECM-ゲル上では低い傾向を示した。しかし ECM-ゲルの内では、Col-I ゲル上でそれらの発現が高く誘導される傾向にあった。さらに分化誘導後 14 日目の未分化マーカー (Nanog) の遺伝子発現レベルも評価した。その発現は GATA4 および MEF2D の発現傾向とは対照的に ECM-TCPS および Col-I ゲル上で低下していた。

この結果は、心筋分化が ECM-TCPS および Col-1 ゲル上で進んでいる-を示している。

また面白いことに FN-ゲル上では、Nanog の発現は高く、GATA4 および MEF2D の発現は低い傾向にあった。以上のことから、iPS 細胞の心筋分化には ECM-TCPS および Col-1-ゲルが求められ、iPS 細胞の未分化維持には FN-ゲル上が求められることが示唆された。

(2) 新生児心筋細胞の拍動心筋細胞誘導

まず、培養 3 日目の拍動関連タンパク (-MHC、TnC1 および TnT2) の遺伝子発現レベルを評価した。TCPS 上では FN が、ゲル上では Col-1 が、これらの遺伝子発現により効果的であった。さらに新生児心筋細胞の分化状況を確認するために、分化誘導後 3 日目の GATA4 の発現を評価した。いずれの培養基質上でもほぼ同様であったが、ゼラチン-TCPS と ECM コーティングなし TCPS 上では大きく減少していた。この GATA4 発現の低下は脱分化を示すものかも知れない。また GATA4 の発現レベルが同様であるにも関わらず、ECM の影響が TCPS 上とゲル上では大きく異なる理由については、2 つのことが考えられる。Col-1-TCPS、ゼラチンおよび FN ゲルが拍動関連タンパクの発現を抑制していること、あるいは、FNTCPs および Col-1 ゲルは拍動関連タンパクの発現を誘導することである。さらに FNTCPs および Col-1 ゲル上で多くの拍動が観察された結果は、拍動関連タンパクの発現傾向と一致した。

(3) 新生児心筋細胞の拍動心筋細胞維持

新生児心筋細胞の拍動維持への培養基質の影響を調べるため、新生児心筋細胞の拍動コロニー数の経時的変化 (培養 1, 3, 7, 14, 21 日目) を評価した (Figure.5A)。どの培養基質上においても、培養 3 日目までは増加し、3 日目以降は徐々に減少した。また ECM-TCPS 上では 22 日目には拍動は完全に止まったが、ECM-ゲル上では拍動は維持されていた。この結果は拍動維持には培養基質の弾性が重要である-を示唆した。また培養 3 日目に対する 21 日目の拍動コロニー数の比率は、Col-1-9 および 20kPa ゲルと Gela-20kPa ゲルの上で最も高かった (Figure.5B)。

(4) iPS 由来心筋細胞の拍動

さらに、iPS 由来心筋細胞の拍動への培養基質の影響を調べるため、拍動コロニー数の経時的変化 (分化誘導後 7, 8, 11, 14, 18, 22, 26 日目) を評価した。ほとんどの培養基質上においても、8 日目から拍動細胞が出現し 14 日目までは増加した。14 日目の数は ECM-20kPa ゲル上で最も多く、基質が硬いほど少ない傾向にあった。ECM による違いはゲル上ではなかったが、TCPS 上では Col-1 で多い傾向にあった。またどの培養基質上でも 14 日目以降は徐々に減少し、ECM-TCPS 上では 22 日目に拍動が完全に停止した。一方で ECM-

ゲル上では拍動が維持される傾向にあった。また面白いことに、ECM-9kPa ゲルおよび FN-TCPS 上では期間を通して拍動細胞は観察されなかった。

(5) 培養基質の影響の概要

心筋分化、拍動誘導、拍動維持の 3 ステップに特に影響を与えた培養基質をまとめた (図 1)。iPS 細胞の結果から、心筋分化には Col-1-, Gela-TCPS および Col-1-20, 180kPa-ゲルが効果的であった。続く拍動関連タンパク誘導でも Col-1-, Gela-TCPS および Col-1-20kPa-ゲルが、さらに拍動誘導や拍動維持には Col-1-20-kPa-ゲルが効果的であった。また新生児心筋細胞の結果から、拍動関連タンパク誘導と続く拍動誘導には Col-1-ゲルおよび FN-TCPS が効果的な培養基質であり、続く拍動維持には Col-1-gel が効果的であった。また、未分化維持においても基材の影響が見いだされ、今後さらに詳細に検討を続ける

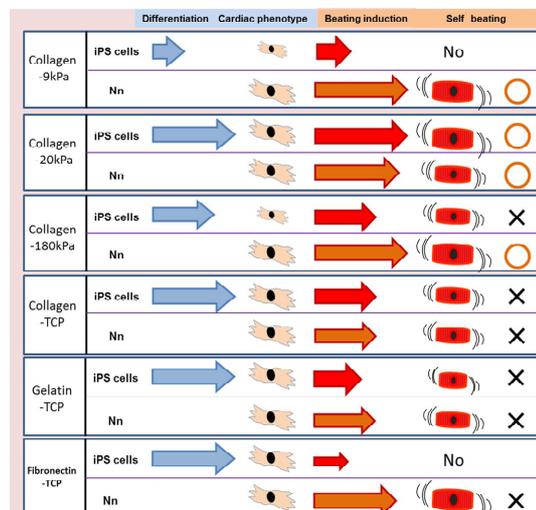


図 1 拍動心筋細胞分化プロセスにおける培養基質の影響の概要

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

Fujita T, Kobayashi J, Hata H, Seguchi O, Sato T, Yanase M, Murata Y, Sunami H, Nakatani T, Aortic valve closure for rapidly deteriorated aortic insufficiency after continuous flow left ventricular assist device implantation. J Artif Organs Vol.16, 2013, pp.98-100, 査読有 DOI IO.1007/s10047-012-0661-5

Kakinoki S, Seo, JH, Inoue Y, Ishihara K, Yui N, Yamaoka T. A large mobility of hydrophilic molecules at the outmost layer controls the protein adsorption and adhering behavior with the actin fiber orientation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Journal of

Biomaterials Science, Polymer Edition, Vol.24, No.11, 2013, pp 1320-1332 査読有
DOI:10.1080/09205063.2012.757726

Iwashima Y, Yanase M, Horio T, Seguchi O, Murata Y, Fujita T, Toda K, Kawano Y, Nakatani T, Impact of ump replacement on outcome in advanced heart failure patients with left ventricular assist system. , Artificial Organs Vol.37, No. 7, 2013, pp.606-614, 査読有
DOI:10.1111/aor.12045

Suwa H, Seguchi O, Fujita T, Murata Y, Hieda M, Watanabe T, Sato T, Sunami H, Yanase M, Hata H, Nakatani T, Paracorporeal ventricular assist device as a bridge to transplant candidacy in the era of implantable continuous-flow ventricular assist device., J Artif Organs (in press), 査読有,
DOI 10.1007/s10047-013-0731-3

Fujita T, Kobayashi J, Hata H, Murata Y, Seguchi O, Yanase M, Shimahara Y, Sato S, Nakatani T, Off-pump coronary artery bypass grafting for a left main lesion due to cardiac allograft vasculopathy in Japan: first report of a case., Surg Today, 2013.7.3, 査読有
DOI:10.1007/s00595-013-0651-0

Sato T, Seguchi O, Morikawa N, Hieda M, Watanabe T, Sunami H, Murata Y, Yanase M, Hata H, Fujita T, Nakatani T, A heart transplant candidate with severe pulmonary hypertension and extremely high pulmonary vascular resistance., J Artif Organs, Voi.16, 2013, pp.253-257, 査読有
DOI 10.1007/s10047-013-0695-3

Seguchi O, Fujita T, Murata Y, Yanase M, Higashi M, Toda K, Nakatani T, Bone-destroying candida infection following left ventricular assist device explant. J Artif Organs, Vol.16, 2013, pp.258-262, 査読有
DOI 10.1007/s10047-013-0696-2

中谷武嗣、秦 広樹、藤田知之、小林順二郎、村田欣洋、瀬口 理、築瀬正伸、堀 由美子、和田恭一、植田初江、宮田茂樹、内藤博昭、心臓移植および補助人工心臓の経験、胸部外科、Vol. 66、No. 1、2013、pp. 63-67、査読有

Iwashima Y, Yanase M, Horio T, Seguchi O, Murata Y, Fujita T, Toda K, Kawano Y, Nakatani T, Serial changes in renal

function as a prognostic indicator in advanced heart failure patients with left ventricular assist system. , Ann Thorac Surg, Vol. 93, 2012, pp. 816-824, 査読有
DOI:10.1016/j.athoracsur.2011.11.058

Toda K, Fujita T, Kobayashi J, Shimahara Y, Kitamura S, Seguchi O, Murata Y, Yanase M, Nakatani T, Impact of preoperative percutaneous cardiopulmonary support on outcome following left ventricular assist device implantation. Circulation Journal, Vol. 76, 2012, pp. 88-95, 査読有
DOI: 10.1253/circj.CJ-11-0339

Fujita T, Toda K, Yanase M, Seguchi O, Murata Y, Ishibashi-Ueda H, Kobayashi J and Nakatani T, Risk factors for post-transplant low output syndrome., Eur. J Cardio-Thor Surg, Vol. 42, 2012, pp. 551-556, 査読有

〔図書〕(計 5 件)
中谷武嗣、補助循環(IABP, PCPS)「今日の循環器疾患治療指針」、医学書院、2013、pp.348-349

中谷武嗣、心不全における免疫吸着療法「今日の循環器疾患治療指針」、2013、医学書院、pp.349-350

中谷武嗣、慢性心不全の非薬物療法 4. 補助人工心臓と心臓移植 心臓移植の適応について教えてください、「心不全診療 Q&A エキスパート 106 人からの回答」、2012、中外医学社、pp.358-360

中谷武嗣：慢性心不全の非薬物療法 4. 補助人工心臓と心臓移植 心臓移植の手続きについて教えてください、「心不全診療 Q&A エキスパート 106 人からの回答」、2012、中外医学社、pp.361-363

中谷武嗣、ニプロ VAD システム「心臓外科 Knack & Pitfalls 心不全外科治療の要点と盲点」、2012、文光堂、pp.174-179

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中谷 武嗣 (NAKATANI Takeshi)
独立行政法人国立循環器病研究センター・病院・部長
研究者番号：60155752

(2)研究分担者

山岡 哲二 (YAMAOKA Tetsuji)
独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・部長
研究者番号：50243126