

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790277

研究課題名(和文)再生医療を目的とした多能性幹細胞による *in vivo* 心筋分化誘導法の開発

研究課題名(英文)Development of a new method to induce cardiomyocytes from pluripotent stem cells *in vivo* for regenerative cell therapy.

研究代表者

吉田 善紀(Yoshida, Yoshinori)

京都大学・iPS細胞研究所・講師

研究者番号：20447965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞から分化誘導した未分化細胞、初期中胚葉-心筋前駆細胞、心筋細胞(早期、中期)の各段階の細胞をマウス心に移植し、光イメージング法により生着効率の比較を行い、分化心筋細胞(中期)を移植することにより効率よく生着することを明らかにした。心筋梗塞モデルマウスへの分化心筋細胞移植で生着した移植細胞は、生体内で分化成熟し、心筋梗塞マウスの心機能を有意に改善させることを確認した。

研究成果の概要(英文)：We compared the grafting efficiency of undifferentiated cell, early mesodermal cells, cardiomyocytes (early- and middle-stage) from human iPS cells in transplantation into mouse hearts, and found that middle-stage differentiated cardiomyocytes can be grafted efficiently. We also observed that transplanted differentiated cardiomyocytes can survive and mature in the infarcted mouse hearts and improve the cardiac function.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：再生医学

### 1. 研究開始当初の背景

心機能の著明に低下した心不全患者に対して次世代の治療法として細胞移植による心臓再生治療は注目されつつある。また細胞治療の細胞ソースとして心筋細胞への分化能をもつES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞を用いた研究が進められている。

これまでにヒトES/iPS細胞に対して心筋細胞への定方向性分化誘導を施行し、細胞株による心筋分化効率の違いの比較検討を行い、分化誘導後のトロポニンT抗体を用いたフローサイトメトリー解析による心筋細胞分化効率を評価したところ、細胞株間で心筋細胞への分化誘導効率は大きく異なることが明らかになった。これらの細胞株に特定の細胞内シグナルに作用する化合物Xを投与することにより、分化指向性の低い細胞株においては心筋分化効率が改善し、細胞株間での分化指向性の違いを減少させることが可能であることを見出した。

これまでの、多能性幹細胞を用いた心筋細胞移植は心機能が改善してもその多くは移植細胞が成長因子などを分泌することによる栄養効果(trophic effect)によるものが多く、移植心筋の長期の生着に関しては良い成績が得られていない。また*in vitro*で分化誘導した心筋細胞は電子顕微鏡ではサルコメア構造の発達は心臓組織の心筋細胞と比べると未熟であった。このように、*in vitro*で分化誘導した心筋細胞は移植時の生着率の低さやサルコメア構造の発達が未熟であるなどの問題がある。未分化なES/iPS細胞の移植は奇形腫を形成し心筋細胞への分化は認められないが、分化誘導早期に出現するKDR(VEGFR2)が低レベルで発現する細胞(KDR low細胞)は心筋細胞へと分化する能力を持つ(Yang et al, nature 2008)。これらのKDR low細胞をソーティングにより選別し、マウスの心筋内に移植すると、トロポニン陽性心筋細胞へと分化する。これらの細胞は心血管前駆細胞であり心血管系細胞への分化の運命決定がなされていると考えられる。より幼若な細胞ほど*in vitro*においては、増殖能は高い。そのため、心筋分化能を持つ比較的幼若な細胞の移植は正着に成功すればその高い増殖能により、心筋細胞の効率の良い生着と周辺組織へのインテグレーションが可能である可能性がある。このように細胞の性質は心筋分化の各段階において異なるため様々な段階の細胞において移植後の生着効率について検討する必要があると考えられる。

本研究においては未分化多能性幹細胞から初期中胚葉、心筋前駆細胞を経て心筋細胞へと分化する各段階の細胞を移植し、*in vivo*で成熟心筋細胞へと分化誘導する系を確立することを目的とした。この研究の知見は、有効な心筋再建治療のために、どの段階の細胞を移植することが、より生着率が高く、移植後に*in vivo*で分化成熟が可能な移植法であるかを明らかにし、再生医療の実用化のため

に役立つことが期待される。

### 2. 研究の目的

心筋梗塞モデルマウスに対してES/iPS細胞から分化誘導した心筋細胞を用いた細胞移植治療により心機能が改善することが報告されているが、移植した心筋細胞が心機能の改善に寄与できるような長期間の生着は難しいと考えられてきた。しかし、より幼若な細胞も含め様々な段階の心筋細胞を移植し、*in vivo*で心筋細胞へ分化成熟を評価し比較することにより、長期間生着し心機能改善に寄与しうる最適な細胞はどのような細胞であるかを検討できると考えた。

心筋細胞の移植後の細胞数(生着効率)を評価するためにルシフェラーゼ恒常発現ヒトiPS細胞を使用する。ヒトiPS細胞由来の初期中胚葉から心筋細胞へ分化する各段階の細胞を用いて移植を行い、細胞の生着を*in vivo*発光イメージングシステムを使用して定量的に評価することにより、どの段階の細胞がより良好な生着効率および移植組織内における分化成熟能を有するかを明らかにし、心機能改善に寄与しうる細胞移植法を開発することが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

生着および心筋細胞への分化効率を評価するために我々はルシフェラーゼ恒常発現iPS細胞株(iPS CAG-luc)を用いて発光イメージングシステムで生着している細胞を*in vivo*モニタリングする方法を用いて*in vivo*で移植した細胞の生着を評価する。

本研究においては、ヒトiPS細胞から*in vitro*で分化誘導した初期中胚葉細胞から心筋細胞に至る各段階の細胞を心筋梗塞モデル免疫不全マウスに移植し、移植後の細胞の生着と*in vivo*における心筋細胞への分化を評価する。ルシフェラーゼを恒常的に発現するiPS細胞株を用い、*in vivo*発光イメージング法を用いて細胞移植施行後から経時的かつ定量的に評価を行うことにより、心筋細胞分化のコミットメントがなされておりかつ効率よく長期生着が可能なものはどの段階の細胞であるのかを明らかにする。

さらに移植時に生着を改善する因子および心筋分化誘導を改善する因子を投与することにより移植法を最適化し、効率よく*in vivo*心筋細胞分化を誘導する方法を開発することを検討している。

### 4. 研究成果

iPS細胞からの胚様体形成法による心筋定方向性分化誘導において細胞株ごとにサイトカイン濃度を最適化し分化効率を検討した、多くのヒトES/iPS細胞株において特定の細胞内シグナルに作用する化合物Xを投与することにより、60-70%の効率で心筋特異的トロポニンT陽性心筋細胞に分化させることができる程度まで心筋分化効率を改善させることが

可能であった。さらに分化誘導法を改良することにより多くの細胞株において80%以上の高効率で心筋細胞を分化誘導することが可能になった。これらの方法で作製した心筋細胞を、心筋特異的なマーカーSIRP、非心筋細胞マーカーCD31, CD140b, CD90, CD49aの抗体の組み合わせによりセルソーターを用いてソーティングすることにより、95%程度の純度の分化心筋細胞を得られた。マイクロアレイ解析により分化心筋の発現プロファイルを解析したところ胎児および成人心臓組織に近い遺伝子発現プロファイルを呈した。この心筋分化系を用いてiPS細胞由来心筋細胞の移植治療における生着効率を測定した。初めに、細胞移植生着効率を経時的に定量化するために、ルシフェラーゼを恒常的に発現するiPS細胞株を用いて、ルシフェラーゼによる発光シグナルと細胞数との関係を調べた。In vitroにおいては細胞数とルシフェラーゼのシグナルは良好な相関を示した。またマウス心臓への細胞移植を行ったところ、移植細胞数とin vivoイメージングシグナルが相関し、in vivoにおいても生着細胞数を定量的に測定できることが分かった。

この細胞株を用いて未分化iPS細胞、中胚葉分化細胞、および分化した心筋細胞(初期、中期)を免疫不全マウス(NOGマウス)の非虚血心に直接注入法により細胞移植を行い、細胞の生着をルシフェラーゼシグナルにより3か月間評価を行った。未分化iPS細胞、中胚葉細胞では生着が認められなかったが、心筋分化細胞においては細胞生着が認められ、中期心筋細胞において生着細胞の高いルシフェラーゼシグナルが認められた。

さらにNOGマウスに左冠動脈前下行枝結紮より心筋梗塞を作製し、本モデルマウスに対してMYH6-EGFPレポーターをもつルシフェラーゼ恒常発現iPS細胞を用いて、invitroで分化誘導した分化細胞のうちMYH6-EGFP陽性の分化心筋細胞をセルソーターで選別し移植したところ生着シグナルが長期間にわたり認められた。心臓組織を採取して凍結切片を作製し抗トロポニンT抗体、抗ヒト核抗体、抗ヒトNKX2-5抗体などを用いて免疫組織染色を行ったところヒトiPS細胞由来移植心筋細胞の生着が認められた。

心機能評価のため心エコー検査を行ったところ対照群と比較して分化心筋細胞移植群において左室短縮率の改善など心機能の有意な改善が認められた。また抗コネキシン43抗体の免疫染色により、移植した心筋細胞は周囲の細胞とギャップ結合を形成し電氣的に同期していると考えられた。これらの結果からiPS細胞より分化させた適切な時期の分化心筋細胞を用いて細胞移植を行うことにより未分化iPS細胞や中胚葉細胞と比べてマウス心臓内に良好な生着が認められ、組織内で生着し心機能の改善に寄与するということが確認された。今後は移植生着心筋の性状についてさらに解析を進めてゆく必要があると考えられる。

## 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5件)

Nakagawa M, Taniguchi Y, Senda S, Takizawa N, Ichisaka T, Asano K, Morizane A, Doi D, Takahashi J, Nishizawa M, Yoshida Y, Toyoda T, Osafune K, Sekiguchi K, Yamanaka S.

A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells.

Scientific Reports、査読有、2014、4:3594. DOI: 10.1038/srep03594.

Miki K, Yoshida Y, Yamanaka S. Making steady progress on direct cardiac reprogramming toward clinical application.

Circulation Research、査読無、2013、113:13-15.

DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301788

Kamakura T, Makiyama T, Sasaki K, Yoshida Y, Wuriyanghai Y, Chen J, Hattori T, Ohno S, Kita T, Horie M, Yamanaka S, Kimura T. Ultrastructural Maturation of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in a Long-Term Culture.

Circulation Journal、査読有、2013、77(5):1307-1314.

DOI: 10.1253/circj.CJ-12-0987

Yoshida Y, Yamanaka S. An emerging strategy of gene therapy for cardiac disease. Circulation Research、査読無、2012、111(9):1108-1110.

DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.278820.

Yoshida Y, Yamanaka S

Labor pains of new technology: direct cardiac reprogramming.

Circulation Research、査読無、2012、111(1):3-4.

DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.271445

[学会発表](計9件)

吉田善紀 iPS細胞を用いた心疾患解析 日本再生医療学会総会(招待講演) 2014/3/5 京都

吉田善紀 疾患 iPS細胞を用いた心疾患研究 日本人類遺伝学会第58回大会(招待講演) 2013/11/23 宮城

吉田善紀 ヒトES/iPS細胞の心筋分化誘導における細胞株間の分化指向性の比較解析 第49回日本移植学会総会「教育セッション1」 2013/9/6 京都

Shunsuke Funakoshi, Takeru Makiyama, Takeshi Kimura, Shinya Yamanaka, Yoshinori Yoshida: A Disease Model of Familial Hypertrophic Cardiomyopathy using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. ISSCR 2013 (2013/6/12-15)

Shunsuke Funakoshi, Takeru Makiyama, Takeshi Kimura, Shinya Yamanaka, Yoshinori Yoshida : Cell Cycle Activation of Hypertrophic Cardiomyopathy : Insights From Research of Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells-Derived Cardiomyocytes. American Heart association's Scientific sessions 2013 , USA (2013/11/16-19)

吉田善紀 循環器領域の臨床応用を目指したiPS細胞研究 第112回尼崎心疾患を語る会 (招待講演) 2013/10/26 尼崎

吉田善紀 臨床応用を目的としたヒトiPS細胞からの心筋細胞の誘導 京阪神心不全研究会 (招待講演) 2013/7/27 大阪

吉田善紀 臨床応用を目指した循環器領域のiPS細胞研究 第4回京都循環器内科カンファレンス 2013/5/11 京都

吉田善紀 循環器領域の臨床応用を目指したiPS細胞研究 武田薬品工業主催第1回 Primary Care Symposium (招待講演) 2013/2/21 京都

Yoshinori Yoshida Analysis of differentiation capacity toward cardiomyocytes from pluripotent stem cells. International Society of Stem Cell Research 10th Annual Meeting. 2012/6/15 神奈川

吉田善紀 臨床応用を目的としたヒトiPS細胞からの心筋分化誘導 講演会「若手医師ファイザー循環器フォーラム in 奈良」(招待講演) 2012/5/24 奈良

吉田善紀 ヒトES/iPS細胞のin vitroの分化誘導における心筋分化効率の検討 厚生労働省科学研究費公開シンポジウム 2012/5/11 群馬

吉田善紀 臨床応用のためのヒトiPS細胞を用いた心筋細胞の分化誘導 近畿心血管治療ジョイントライブ 2012 (招待講演) 2012/4/21 京都

〔図書〕(計 2件)

吉田善紀, 山中伸弥 先端医療技術研究所 先端医療シリーズ 43「循環器疾患の最新医療」2012:29-32

吉田善紀 メディカルドゥ 遺伝子医学 MOOK22 最新疾患モデルと病態解明、創薬応用研究、細胞医薬創製研究の最前線 2012:133-136

〔産業財産権〕  
出願状況(計 3件)

名称: 効率的な心筋細胞の誘導方法  
発明者: 山中伸弥/吉田善紀/三木健嗣  
権利者: 国立大学法人京都大学  
種類: 特許  
番号: 2013-102375  
取得年月日: 2013年05月04日  
国内外の別: 国内

名称: 心筋細胞の選別方法  
発明者: 齊藤博英/吉田善紀/三木健嗣/遠藤慧/高橋誠弥  
権利者: 国立大学法人京都大学  
種類: 特許  
番号: 2013-102375  
取得年月日: 2014年03月20日  
国内外の別: 国内

名称: 新規心筋細胞マーカー  
発明者: 山中伸弥/吉田善紀/舟越俊介  
権利者: 国立大学法人京都大学  
種類: 特許  
番号: 61/672,637  
出願年月日: 2012年07月17日  
国内外の別: 外国

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/yoshida/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 善紀 (YOSHIDA, Yoshinori)  
京都大学・iPS細胞研究所・講師  
研究者番号: 20447965

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：