

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790750

研究課題名(和文)新規3次元培養システムを用いたiPS細胞による心筋再生療法の開発

研究課題名(英文)Novel 3D-culture System for iPS Cell-Derived Cardiomyocytes for Cardiac Repair

研究代表者

柴 祐司 (SHIBA, Yuji)

信州大学・医学部・助教

研究者番号：70613503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：再生医療における新たな心筋細胞移植方法として、3次元培養法による移植方法の検討を行った。ヒトiPS細胞から心筋細胞を作製し、3次元培養を行ったのち、心筋梗塞モデルモルモットに移植したところ、細胞の生着が確認出来た。しかし、GCaMPを用いたイメージング検査により、生着した心筋細胞はホスト心筋とは電気的には結合せず、更に検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Although pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes are a promising tool for cardiac repair following cardiac injury, more study is required to improve the cell engraftment. We tested our novel 3D-culture system for the transplantation of stem cell-derived cardiomyocytes for not only graft cell survival but also electrical integration. The 3D-cultured human iPSC-cardiomyocytes survived following transplantation in injured guinea pig hearts, but they did not couple with host cardiomyocytes by fluorescent Ca sensor GCaMP3 imaging system. Additional study is needed to improve the host-graft electrical integration.

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

1. 研究開始当初の背景

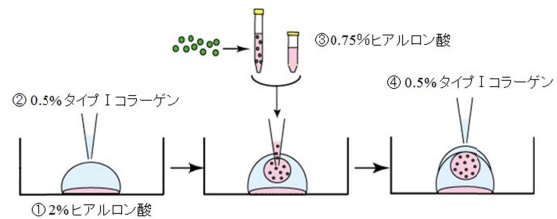
近年、心筋梗塞を始めとする様々な心疾患の末期像である心不全に対して、多能性幹細胞由来心筋細胞移植治療の可能性が注目されている。しかし、臨床応用を目指すにあたって、多くの疑問点や解決すべき問題が残されている。まず第一の疑問点として、細胞移植後の腫瘍形成や不整脈発生といった安全性の懸念が十分に解決されていない。また、移植細胞によって引き起こされ得る免疫拒絶についてもほとんど検討されていない。さらに、これまでの動物実験における移植方法では、移植心筋細胞の多くは移植直後に喪失し、一部の細胞のみが生着するため、多くの細胞移植が必要であった。また、移植した心筋細胞が心収縮力向上に寄与するためには、細胞の生着だけでは不十分であり、宿主心筋細胞と電氣的に統合し、協調して収縮することが必要である。本研究では、これらの問題点の中で、細胞移植後の生着効率と電氣的結合を改善するための新たな試みとして、私達が開発した新規3次元培養法による移植方法を用いた検討を行った。この3次元培養法で骨格筋細胞を培養し、皮下組織に移植した検討では、皮下注射による移植方法と比較して、効率良く細胞が生着することが確認出来ている。

2. 研究の目的

本研究では私達が開発した、ヒアルロン酸、タイプIコラーゲンをを用いたマイクロ3Dカルチャー法を用いて、iPS細胞由来心筋細胞を心筋梗塞モデル動物へ移植し、細胞の生着効率と宿主心筋細胞との電氣的統合について評価した。また、これら実験を行うために、未分化iPS細胞の培養、心筋細胞の分化、蛍光CaセンサーGCaMPのiPS細胞への導入、GCaMPとランゲンドルフ法を用いたイメージングの開発について新たに研究室で行えるようにシステムを構築した。

3. 研究の方法

Essential 8 培地で、feeder 細胞がない状態で培養した未分化ヒト iPS 細胞株 253G1 に対して、マトリゲル®、アクチビン A と BMP4 を連続して添加し心筋細胞の作製を行った。心筋細胞の分化は自発的拍動の確認と心筋トロポニンTの染色を用いたフローサイトメトリー法で行った。作製した心筋細胞をタイプIコラーゲンとヒアルロン酸を用いて3次元的に培養し(下図)、この3次元構造物をそのまま、モルモット心筋梗塞部位の心外膜側に貼付し移植した。



モルモットの心臓は側副血流が発達しているため、冠動脈結紮による心筋梗塞作製は困難なため、Cryoinjury 法により心筋梗塞を作製した。

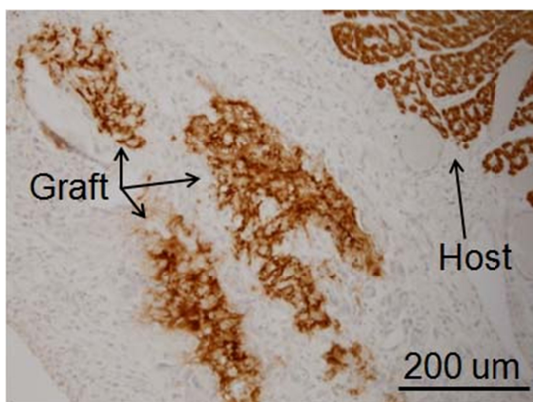
免疫抑制剤としてメチルプレドニゾロンとサイクロスポリンの投与を行い、移植2週間後に心臓を摘出し、組織学的検査を行った。

移植心筋細胞の電氣的活動を評価するために、蛍光CaセンサーであるGCaMPの遺伝子導入を行うこととした。GCaMPは緑色蛍光蛋白(GFP)とカルシウム結合蛋白であるカルモジュリンの複合合成蛋白であり、Ca存在下でGFPを蛍光発色する性質を有している。心筋細胞にこの蛋白を発現させることにより、収縮時に細胞質内のCa濃度が増加することにより、心筋細胞が蛍光発色することが期待される。未分化iPS細胞に対して、Zinc finger法によってAAVS1領域特異的にGCaMP3を遺伝子導入し、この細胞から心筋細胞を作製した。作製した心筋細胞が実際に収縮と一致して蛍光発色するかどうか蛍光顕微鏡で確認した。さらに、GCaMP3陽性ヒトiPS細胞由来心筋細胞をモルモット心臓に移植し、2週間後に再度開胸し、心臓を

摘出し、Langendorff 法で心臓を灌流し再度拍動させながら、蛍光 CMOS カメラで心外膜側から GCaMP3 の蛍光発色を心電図周期と比較しながら評価した。移植心筋細胞と宿主心筋細胞の電氣的統合は GCaMP の蛍光周期（グラフト心筋の収縮周期）と心電図（ホスト心筋の収縮周期）が一致することにより確認出来る。

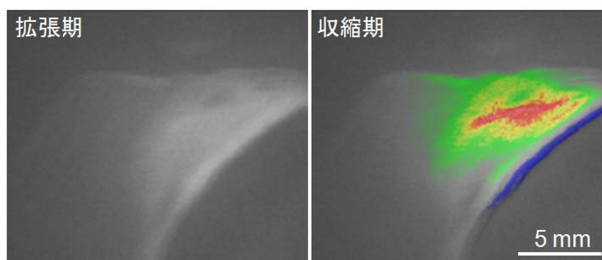
4. 研究成果

Essential8 培地で維持したヒト iPS 細胞にアクチピン A と BMP4 を連続投与することにより、安定した心筋細胞の作製が可能であった。この細胞を 3 次元培養し、心外膜側に移植したところ、一部心筋細胞の生着を認めた（下図）。しかし、グラフト心筋細胞は組織学的にはホスト心筋細胞とは線維組織によって隔絶された状態で生存していた。



次に、蛍光 Ca センサーGCaMP をヒト iPS 細胞に遺伝子導入を行った。まず、エレクトロポレーションによってランダムにゲノム DNA に遺伝子導入を行ったところ、一旦導入された GCaMP は培養を繰り返すことにより、発現が消失し、安定した遺伝子発現が得られなかった。そこで、安定した遺伝子発現が期待できる 19 番染色体上の AAVS1 領域特異的に遺伝子導入を行うこととした。特異的遺伝子導入のために Zinc Finger nuclease を用いて遺伝子導入を行ったところ、GCaMP が AAVS1 領域特異的に導入され、安定した遺伝子発現が認められた。さらに、GCaMP

陽性 iPS 細胞から心筋細胞を作製したところ、この細胞は in vitro において収縮期に蛍光発色することが確認された（下図）。



この GCaMP 陽性心筋細胞を 3 次元培養し、モルモット心臓に移植し、免疫抑制剤投与下で 2 週間飼育した後、心臓を摘出し、Langendorff 法で心臓を再拍動させ、心外膜側から蛍光 CMOS カメラで観察したところ、ホスト心筋細胞の収縮と一致する蛍光シグナルは認められなかった。これらの結果から、この 3 次元培養法では、移植後の細胞生着は認められるものの、ホスト心筋との電氣的結合がみられないことが示唆され、更に検討が必要と考えられた。

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 6 件)

1. Kashima Y, Takahashi M, Shiba Y, Itano N, Izawa A, Koyama J, Nakayama J, Taniguchi S, Kimata K, Ikeda U. Crucial role of hyaluronan in neointimal formation after vascular injury. *PLoS One*. 8(3):e58760, 2013 査読有 doi:10.1371/journal.pone.0058760
2. Yamasaki S, Izawa A, Shiba Y, Tomita T, Miyashita Y, Koyama J, Ikeda U. Presence of diastolic dysfunction in patients with peripheral artery disease. *Angiology*. 64(7):540-543,2013 査読有 doi: 10.1177/0003319713476135.
3. Shiba Y, Ikeda U. Prostacyclin: a potential new target for endothelial progenitor

cell-mediated angiogenesis. *Circ J*. 77(4):906-907,2013 査読有 PMID: 23412756

4. Saigusa T, Izawa A, Miura T, Ebisawa S, Shiba Y, Miyashita Y, Tomita T, Koyama J, Fukui D, Takano T, Amano J, Ikeda U. Low levels of high-density lipoprotein cholesterol predict the presence of coronary artery disease in patients with aortic aneurysms. *Angiology* .2013 in press 査読有 PMID:24019083
5. Shiba Y, Fernandes S, Zhu WZ, Filice D, Muskheli V, Kim J, Palpant NJ, Gantz J, Moyes KW, Reinecke H, Van Biber B, Dardas T, Mignone JL, Izawa A, Hanna R, Viswanathan M, Gold JD, Kotlikoff MI, Sarvazyan N, Kay MW, Murry CE, Laflamme MA. hESC-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. *Nature*. 489(7415):322-325,2012 査読有 doi: 10.1038/nature11317.
6. Matsuura K, Wada M, Shimizu T, Haraguchi Y, Sato F, Sugiyama K, Konishi K, Shiba Y, Ichikawa H, Tachibana A, Ikeda U, Yamato M, Hagiwara N, Okano T. Creation of human cardiac cell sheets using pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 425(2):321-327,2012 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2012.07.089.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 柴 祐司 .iPS/ES 由来心筋細胞の細胞移植治療 - 動物実験 - . 第 30 回日本心電学会学術集会 . 2013.10.11-12 ; リンクステーションホール青森他
2. 柴 祐司 . ES 細胞を用いた心筋再生療法 : 心機能改善メカニズムと不整脈抑制

効果 . 第 4 回循環・代謝・炎症・病態研究セミナー . 2013.5.27 ; 群馬大学 講演

3. 柴 祐司 . ヒト ES 細胞を用いた心筋梗塞治療 第 12 回松本ボーンフォーラム . 2013.5.17-18 ; 信州大学医学部附属病院
 4. 柴 祐司 . ヒト ES/iPS 細胞を用いた心筋梗塞治療の開発 . 第 115 回中信医学会ミニレクチャー講師 . 2013.5.11 ; アプロード (大町市)
 5. Shiba Y. Human ES-Cell-Derived Cardiomyocytes Electrically Couple and Suppress Arrhythmias in Injured Hearts. 第 77 回日本循環器学会学術集会 . 2013.3.15-17 ; パシフィコ横浜
 6. 柴 祐司 . Human ESC-derived cardiomyocytes integrate and suppress arrhythmias in a guinea pig infarct model . 第 124 回 iCeMS セミナー . 2012.11.26 ; 京都大学 セミナー演者
 7. 柴 祐司 . 万能性幹細胞を用いた心筋再生療法の開発 第 34 回心筋生検研究会 . 2012.11.23-24 ; 信州大学医学部附属病院 シンポジウム演者
 8. 柴 祐司 .iPS 細胞による心臓病の治療 . 信大 “ チーム動脈硬化血管内治療 ” メンバーによる市民公開講座 . 2012.11.18 ; ホクト文化ホール
 9. 柴 祐司 .ES 細胞を用いた心筋再生療法の開発 . 第 10 回オータム循環器カンファランス . 2012.10.27 ; 東京
- 6 . 研究組織
(1)研究代表者
柴 祐司 (SHIBA, Yuji)
信州大学・医学部・助教
研究者番号 : 70613503