

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461118

研究課題名(和文) ヒト心臓幹細胞からの心筋分化誘導法の樹立～心疾患テーラーメイド医療へのシナリオ～

研究課題名(英文) Establishment of the method to differentiate human cardiac stem cells into cardiomyocytes

研究代表者

細田 徹 (HOSODA, Toru)

東海大学・創造科学技術研究機構・准教授

研究者番号：50608601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：c-kit陽性ヒト心臓幹細胞(CSC)は心筋や冠血管を再生し、器官の恒常性を維持している。本研究はCSCの心筋分化誘導法の確立を目標とした。

先行研究を参考に、生理活性物質を種々の組み合わせでCSCに作用させたが、分化誘導は達成されなかった。方針を転換し、CSCとiPS細胞をトランスウェルで仕切って共培養しつつ、既知の分化誘導を施した。すると、iPS細胞には14日目から、CSCには30日目から拍動細胞塊が現れ、少なくとも2週間以上持続した。

CSCからin vitroで拍動細胞を得ることに初めて成功した。作用している因子が同定できれば、従来よりも生理的な心筋の高効率な分化誘導が期待される。

研究成果の概要(英文)：Human c-kit-positive cardiac stem cells (CSCs) renew cardiomyocytes and coronary vessels maintaining the homeostasis of the organ. This study aimed to establish the method to differentiate CSCs into cardiomyocytes in vitro.

Referring to preceding researches, physiologically active substances were applied to CSCs in various combinations, but myocardial differentiation was not achieved. Accordingly, we altered our approach; CSCs and human induced pluripotent stem cells (iPSCs) were co-cultured without a direct contact each other using the Transwell system and treated with an established condition for the myocardial differentiation of iPSCs. As a result, iPSCs and CSCs started to beat on day 14 and 30, respectively, and continued for at least 2 weeks.

Beating cells were prepared from CSCs in vitro for the first time. By identifying the critical factor(s) involved in the process, we can expect to obtain more physiological cardiomyocytes with high efficiency compared to former approaches.

研究分野：循環器内科学、幹細胞生物学、再生医学

キーワード：心臓幹細胞 心筋分化 心不全

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、2007年にc-kit陽性ヒト心臓幹細胞(Cardiac Stem Cell; CSC)の存在を世界に先駆けて報告し(Bearzi C, Hosoda T et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007)、様々な動物実験モデルや、慢性虚血性心不全患者に対する第I相臨床試験(Bolli R, Hosoda T et al. *Lancet* 2011)を通じて、この細胞の治療的応用の可能性を明らかにして来た。また生理的条件下において、CSCの分裂・分化・遊走機能により、ヒトの一生の間に、心筋全体が10回以上も置き換えられていることも示した(Kajstura J, Hosoda T et al. *Circ Res* 2010)。

こうした一連の研究結果から、生体内環境でのCSCの分化能力は明らかと言えるが、体外では、例えばCSCを新生仔ラット心筋細胞と共培養すると高率に心筋に分化するものの、通常の培養条件下では、CSCは拍動する心筋には成熟分化しない。その分化過程には、生体内の他の細胞や因子等が関わっているものと推測されるが、現時点では不明である。

一方、近年、胎生期の心臓発生に関与する分子メカニズムが詳細に検討され、こうした知見に基づき、胚性幹(ES)細胞や人工多能性幹(iPS)細胞に対し、様々な因子を作用させて心筋様の細胞へと分化・誘導させる試みが数多くなされている。ただし、iPS細胞の分化や、線維芽細胞等の形質転換により得られた心筋様の細胞は、人為的に作成されたものであり、果たしてそれらが本来の心筋細胞の性質を備え、薬剤等に対して同様の反応を示すのか、未知の部分も残されている。

翻って、c-kit陽性ヒトCSCは、心臓内の幹細胞ニッチと呼ばれる領域に格納され、組織の需要に応じて分裂・分化して心筋細胞を形成している細胞集団であり、この分化誘導により得られる心筋は、心臓から単離される心筋に非常に近い性質を持つものと想定され、薬効等を評価する上で理想的なツールと考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、c-kit陽性ヒト心臓幹細胞の心筋への分化誘導法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

心疾患に対する薬剤治療の主たる対象となる高齢患者について、インフォームド・コンセントに基づき、開心術の際に必然的に切離される心臓組織片を用いてCSCを単離・培養する。得られたCSCについては、幹細胞表面抗原c-kitに対する免疫細胞染色により、細胞選別の特異性を検証する。

CSCの遺伝子発現を調べると、発生期の分化段階では、心臓中胚葉以降の細胞に相当すると考えられる。従って、CSCの心筋細胞への分化戦略として、胎生期の心臓発生、並びにESないしiPS細胞の心筋への分化誘導研

究で得られた知見を援用することで、その過程に関わる因子やプロセスを同定することが期待される。

具体的には、マトリゲル上での培養(Uosaki H et al. *PLoS One* 2011; 6: e23657)、Wntシグナルの抑制(Willems E et al. *Circ Res* 2011; 109:360) (Ren Y et al. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 51:280)、アスコルビン酸による刺激(Cao N et al. *Cell Res* 2012; 22:219)、Nodal及びBMPシグナルの抑制(Kattman SJ et al. *Cell Stem Cell* 2011; 8:228)、レチノイン酸の抑制(Zhang Q et al. *Cell Res* 2011; 21:579)、トリヨードサイロニンによる刺激(Lee YK et al. *Mol Endocrinol* 2010; 24:1728)といった要素が、単独或いは複合的に作用して、心筋への分化を促進していると想定される。

CSCに対して、転写因子等の遺伝子発現調節によらずに、なるべく少数の生理活性物質を作用させることによって、成熟した拍動心筋を生成することを目標とする。そのため、初めの戦略としては、マトリゲルの有無によって二群に分け、更に、Wntシグナルの抑制、アスコルビン酸による刺激、Nodal及びBMPシグナルの抑制、レチノイン酸の抑制、トリヨードサイロニンによる刺激のそれぞれの有無によって条件を分けて、計20通りの培養・刺激方法により、少なくとも1ヶ月間は経時的にCSCの分化の様子を観察し、拍動心筋細胞の生成の有無を確かめる。

4. 研究成果

まず、成人の開心術時に切離される組織からCSCを単離・培養した。初期の試みとして、転写因子等の遺伝子発現調節によらずに、少数の生理活性物質を作用させて心筋の生成を目指した。先行研究を参考に、マトリゲル上での培養や、心臓発生に重要な因子として、Wntシグナルの抑制、アスコルビン酸による刺激、Nodal及びBMPシグナルの抑制、レチノイン酸の抑制、トリヨードサイロニンによる刺激といった、分化誘導効果が期待される諸条件を、種々の組み合わせでCSCに作用させた。細胞の拍動の有無を心筋分化の指標とした他、定量的RT-PCRにより心筋に特異的な遺伝子の発現を解析したが、上記の条件では分化誘導は達成されなかった。

方針を転換し、ヒトiPS細胞を陽性コントロールとして、既存の分化条件を試みたところ、細胞の拍動が観察された。分化誘導されたiPS細胞は、CSCに比して多様な細胞を含み、それらの分泌因子が心筋分化に重要である可能性が想定された。そこで、CSCとiPS細胞を、ポアサイズ0.4マイクロメートルのトランスウェルで仕切って共培養しつつ、分化誘導を施した。すると、iPS細胞には14日目から、CSCには30日目から拍動細胞塊が現れ、少なくとも2週間以上持続した。

CSCは、他の細胞と比較して純度と未分化度が高いために、これまで*in vitro*での分

化誘導は難しいと考えられていたが、今回初めて拍動細胞を得ることに成功した。更に、この分化過程で作用している因子を突き止められれば、高効率な心筋分化誘導が期待される。

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 16 件)

(1) Hayashi E, Cho Y, Inoue M, Murakami T, Hosoda T.

The characterization of cardiac stem cells obtained from patients who have received left ventriculoplasty.

Stem Cell Transl Invest 2015; 2(1):e537-540.

査読あり

DOI: 10.14800/scti.537

(2) Hayashi E, Hosoda T.

How do resident stem cells repair the damaged myocardium?

World J Stem Cells 2015 Jan 26;7(1):182-5.

査読あり

DOI: 10.4252/wjsc.v7.i1.182

(3) Leri A, Rota M, Hosoda T, Goichberg P, Anversa P.

Cardiac stem cell niches.

Stem Cell Res 2014 Nov;13(3):631-46.

査読あり

DOI: 10.1016/j.scr.2014.09.001

(4) Hayashi E, Hosoda T.

Myocyte renewal and therapeutic myocardial regeneration using various progenitor cells.

Heart Fail Rev 2014 Nov;19(6):789-97.

査読あり

DOI: 10.1007/s10741-014-9430-2

(5) Cho Y, Hosoda T, Tashiro R, Shimura S, Tanaka C, Ueda T.

Internal mammary arterio-cardiac venous shunt enhances angiogenesis of bone marrow mononuclear cells in swine.

Exp Clin Cardiol 2014; 20(9):5625-55.

査読あり

(6) Hosoda T.

Myocardial repair by resident stem cells; the potential mechanism of action.

J Cardiol Ther 2014 Aug 10;1(7):150-3.

査読あり

<http://www.ghrnet.org/index.php/jct/article/view/800/902>

(7) Signore S, Sorrentino A,

Ferreira-Martins J, Kannappan R, Shafaie M, Del Ben F, Isobe K, Arranto C, Wybieralska E, Webster A, Sanada F, Ogórek B, Zheng H, Liu X, Del Monte F, D'Alessandro DA, Wunimenghe O, Michler RE, Hosoda T, Goichberg P, Leri A, Kajstura J, Anversa P, Rota M.

Response to letter regarding article "inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and human left ventricular myocytes".

Circulation 2014 May 27;129(21):e510-1.

査読あり

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.009347

(8) 林 恵美子、細田 徹.

血管・心筋再生医療の展開.

medicina 2014 Apr;51(4):718-21.

査読なし

(9) Sanada F, Kim J, Czarna A, Chan NY, Signore S, Ogórek B, Isobe K, Wybieralska EW, Borghetti G, Pesapane A, Sorrentino A, Mangano EN, Cappetta D, Mangiaracina CM, Ricciardi M, Cimini M, Ifedigbo E, Perrella MA, Goichberg P, Choi AM, Kajstura J, Hosoda T, Rota M, Anversa P, Leri A.

c-kit-positive cardiac stem cells nested in hypoxic niches are activated by stem cell factor reversing the aging myopathy.

Circ Res 2014 Jan 3;114(1):41-55.

査読あり

DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302500

(10) Hosoda T.

Clinical application of cardiac stem cells.

Cell Biol: Res Ther 2013 Nov;S1:ID 1567, 2 pages.

査読あり

http://www.scitechnol.com/clinical-application-of-cardiac-stem-cells-PI7L.pdf?article_id=1567

(11) Hosoda T.

The mircrine mechanism controlling cardiac stem cell fate.

Front Genet 2013 Oct 10;4:204.

査読あり

DOI: 10.3389/fgene.2013.00204

(12) Signore S, Sorrentino A, Ferreira-Martins J, Kannappan R, Shafaie M, Del Ben F, Isobe K, Arranto C, Wybieralska E, Webster A, Sanada F, Ogórek B, Zheng H, Liu X, Del Monte F, D'Alessandro DA, Wunimenghe O, Michler RE, Hosoda T, Goichberg P, Leri A, Kajstura J, Anversa P, Rota M.

Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and

human left ventricular myocytes.
Circulation 2013 Sep 17;128(12):1286-97.
査読あり
DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002764

(13) Hayashi E, Hosoda T.
Therapeutic application of cardiac stem cells and other cell types.
Biomed Res Int 2013 Jun;2013:ID 736815, 6 pages.
査読あり
DOI: 10.1155/2013/736815

(14) Dey D, Han L, Bauer M, Sanada F, Oikonomopoulos A, Hosoda T, Unno K, De Almeida P, Leri A, Wu JC.
Dissecting the molecular relationship among various cardiogenic progenitor cells.
Circ Res 2013 Apr 26;112(9):1253-62.
査読あり
DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.300779

(15) 林 恵美子、細田 徹.
再生医療-細胞移植治療の進歩と展望-。
カレントセラピー 2013 Apr;31(4):406-11.
査読なし

(16) 林 恵美子、田中千陽、細田 徹.
心臓幹細胞とエイジング。
Heart View 2013 Apr;17(4):379-84.
査読なし

〔学会発表〕(計 13 件)

(1) 細田 徹. 2015 年 11 月 8 日に第 5 回 Translational Bioinformatics Conference 年次集会(ベルサール西新宿)にて基調講演「Translational Perspectives of Cardiac Regenerative Medicine」

(2) 細田 徹. 2014 年 12 月 4 日に産学連携フォーラム(横浜情報文化センター)にて口述発表「心不全の特効薬となる劇的な幹細胞治療の産業化へ向けた提案」

(3) 細田 徹. 2014 年 11 月 6 日に第 52 回 最新臨床医学を学ぶ会(宇都宮グランドホテル)にて招待講演「慢性虚血性心不全に対する心臓幹細胞移植による新しい治療法」

(4) 細田 徹. 2014 年 9 月 5 日に第 5 回 Molecular Cardiovascular Conference II(神戸ベイシェラトンホテル、兵庫)にてポスター発表「増殖分化因子 GDF11 は心臓幹細胞の増殖を促進する」

(5) 細田 徹. 2014 年 8 月 30 日に欧州心臓学会議(バルセロナ、スペイン)にてポスター発表「GDF11 enhances proliferation of

human cardiac stem cells.」

(6) 細田 徹. 2014 年 5 月 22 日に第 137 回 姫路循環器研究会 学術講演会(姫路市医師会館、兵庫)にて招待講演「心臓幹細胞による心不全治療」

(7) 細田 徹. 2014 年 4 月 12 日に第 111 回 日本内科学会総会(東京国際フォーラム)にてポスター発表「心臓の若返り因子 GDF11 は、内因性心臓幹細胞の増殖を促進する」

(8) 細田 徹. 2014 年 4 月 3 日にラジオ日経「医学講座」にて放送「心臓再生の現状と展望」

(9) 細田 徹. 2014 年 3 月 21 日に第 78 回 日本循環器学会学術集会(東京国際フォーラム)のシンポジウムにて講演「The Most Promising Cell Therapy for the Failing Heart and its Application in Japan」

(10) 細田 徹. 2013 年 11 月 23 日に第 17 回 日本心血管内分泌代謝学会 学術総会(千里ライフサイエンスセンター、大阪)にて座長及び招待講演「第三世代心臓幹細胞の同定と臨床応用」

(11) 細田 徹. 2013 年 10 月 28 日に杉並循環器病診連携懇話会(阿佐ヶ谷、東京)にて招待講演「心臓幹細胞が描き出す未来」

(12) 細田 徹. 2013 年 9 月 7 日に第 4 回 Molecular Cardiovascular Conference II(キョク、北海道)にてポスター発表「第三世代ヒト心臓幹細胞による心不全治療」

(13) 細田 徹. 2013 年 6 月 20 日に第 53 回 城西循環器病研究会(新宿)にて特別講演「心臓幹細胞による心不全治療」

〔図書〕(計 3 件)

(1) 細田 徹.
心臓幹細胞.
再生医療用語ハンドブック.(日本再生医療学会、メディカルトリビューン) 2015 Mar;p.81.

(2) Leri A, Rota M, Hosoda T, Anversa P. Cellular basis for myocardial regeneration and repair. In: Mann DL, Felker MG. Heart Failure: A Companion to Braunwald's Heart Disease, 3rd Edition. (Elsevier, Philadelphia, PA) 2014;p.42-61.

(3) 細田 徹.
臨床試験事例.
再生医療事業の課題解決のための手引書.

(技術情報協会) 2013 Sep;p.441-7.

〔その他〕

ホームページ

http://www.pr.tokai.ac.jp/tuiist/english/tt/announcement_hosoda.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細田 徹 (HOSODA, Toru)

東海大学・創造科学技術研究機構・特任准教授

研究者番号：50608601

(2) 研究協力者

友池 仁暢 (TOMOIKE, Hitonobu)

榊原記念病院・院長

研究者番号：90112333

井口 信雄 (IGUCHI, Nobuo)

榊原記念病院・循環器内科放射線科・部長

研究者番号：90232165

高梨 秀一郎 (TAKANASHI, Shuichiro)

榊原記念病院・心臓血管外科・主任部長

研究者番号：30206776