

平成 28 年 10 月 5 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462144

研究課題名(和文) 心房組織を用いたiPS細胞作成および直接的な筋細胞誘導法による心房細動の病態解明

研究課題名(英文) Inducation of iPS cell and direct reprogramming - pathophysiology of atrial fibrillation

研究代表者

井口 篤志 (Iguchi, Atsushi)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：90222851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：心臓細動の患者からメイズ手術で得られた心房組織から分別した線維芽細胞では、筋線維芽細胞が高発現している。筋線維芽細胞は周囲の急性炎症や慢性炎症の結果生じる病態心臓で見られる間葉系細胞の収斂スポットである。皮膚線維芽細胞や心臓線維芽細胞と比較して形態、増殖性は殆ど差異がないが、少なくともこの細胞を用いてiPS細胞は誘導されない。遺伝子レベルでは α -SMAやMyoDを高発現しているが、iPS細胞誘導抑制原因遺伝子は同定されていない。最近の論文では、iPS細胞誘導の際、4因子導入後に間葉系遺伝子のdownregulationが生じるとしているが、線維芽細胞を用いた場合、それは生じないことが判明した。

研究成果の概要(英文)：Most of the fibroblast separated from atrium tissue provided by Maize operation from a patient with atrial fibrillation, is a myofibroblast. Myofibroblasts are mesenchymal cells found in the pathological heart resulting from acute inflammation and chronic inflammation. If dermal fibroblasts are compared to the cardiac fibroblast, these two cells are not little difference in terms of morphology and growth potential, but the iPS cells are not derived using myofibroblast cells. Myofibroblast has high expression of α -SMA and MyoD at the genetic level, but a particular gene which inhibit the induction of iPS was not identified. Several papers described that in the process of iPS induction, downregulation of mesenchymal gene occurs after four factors introduced, but we found that if using a fibroblast cell, there is no downregulation of mesenchymal gene.

研究分野：心臓外科学

キーワード：iPS細胞 心房細動 メイズ手術 皮膚組織 左心耳組織 筋線維芽細胞 線維芽細胞 山中4因子

1. 研究開始当初の背景

当心病センターではこれまで、心房細動に対するメイズ手術の際に廃棄される左心耳と、同一患者でドレーン挿入部の皮膚から Induced pluripotent stem cells (iPSCs) を誘導する研究を行ってきた。

iPSCs は、日本の山中グループが開発し、受精を前提に作成される万能細胞

(embryonic stem cells) と異なり作製過程における倫理的問題点にも抵触することなく、世界中の研究者がその作成に没頭している。体細胞には固有の記憶が存在し、その記憶により細胞運命は決定される。この記憶のメカニズムはエピジェネティックな制御により行われている。iPSCs 技術のハイライトは、体細胞に山中 4 因子

(Oct3, Sox2, Klf4, Myc) を導入することでこれらの記憶を消去し、どんな細胞にも変化可能な細胞を獲得することである。従って iPSCs 研究は、再生技術だけに恩恵をもたらすだけでなく、疾患形成のメカニズム解明にもツールとして十分なアドバンテージを我々に提供する。iPSCs より誘導された標的細胞は、理論的には生活習慣や加齢に伴い進行した疾患の病態前の状態を呈するはずであり、理論上比較検討が可能となる。患者体細胞から iPSCs の樹立

(patient derived iPSCs) の重要性はこのためである。現在、侵襲性の少ない組織から採取された体細胞(皮膚、血液など)からの iPSCs の誘導が行われているが、patient derived iPSCs も理論的には 2 種類の体細胞が存在する。患者の正常組織からの体細胞、そして罹患臓器からの体細胞を用いた iPSCs である。iPSCs は、理論的には強力に記憶消去が行われるが、完全消去までいたっていない可能性はあり、その為誘導しやすい体細胞は存在すると考えられているが、科学的根拠はなされていない。仮にそうであるならば、患者の生活習慣の

変調からエピジェネティックな制御の変化を誘導し疾患に至ると考えられる生活習慣病(心疾患)となった罹患臓器は、疾患の立場から見た場合、より記憶の消去は困難と考えられる。従って同一の患者からの異なった 2 種類の体細胞(正常、罹患)の比較は極めて重要である。

心病センターではこれまで、200 mg ~ 400 mg の左房組織並びに皮膚組織を細切し、線維芽細胞の初代培養を得る研究を進めてきた。これら同一患者より分離培養された 2 種類の線維芽細胞を用いて、山中 4 因子をエピソーマルベクターに組み込み、電気穿孔法を用いて遺伝子導入し iPSCs 誘導を施行した。皮膚組織由来線維芽細胞からは、patient derived iPSCs、そして心筋細胞群の誘導に成功している(図 1)。現在誘導された iPSCs は、心筋細胞群分別の為、冷凍保存されている。メイズ手術により切離された心耳より分別培養された線維芽細胞は、 α -smooth Muscle Actin(α -SMA)を高発現している筋線維芽細胞(Myofibroblasts)がほとんどであり、病態を有した組織と言えよう。興味深いことにこの筋線維芽細胞からは、iPSCs 誘導が全くかからず、ほとんどの細胞が誘導後に増殖せず老化し、死細胞に至ることが発見された。即ち、同一患者でも皮膚由来線維芽細胞は iPSCs 誘導が起こるが、左房由来の筋線維芽細胞からは誘導されない。このことはいまままで報告されておらず、全く新しい知見である。さらに、皮膚由来の線維芽細胞も継代を重ねると α -SMA が発現し、iPSCs 誘導が困難になることが観察されている。山中グループは増殖性を有するどの体細胞でも iPSCs 誘導されると推測しているが、心病センターのこれまでの研究はこの見解に合致しているとは云えない。

2. 研究の目的

新たに見つかった左房由来の筋線維芽細胞のiPSCs誘導の詳細なプロトコルの確立し、同一患者異なる組織から誘導されたiPSCsの品質の確認をすることをプロジェクト目標とする(図 3)。

3. 研究の方法

メイズ手術で通常切離破棄されている左房組織を使い研究に用いる。剥離された左房組織の一部を1mm-2mmの小片に細切し、培養皿に付着させる。組織より分泌される体液をのり替わりにし、約20分乾燥後に20%FBS/DMEMにグルタマックス、ペントシリン/ストレプトマイシンを加えた培養液にて培養を開始する。約10日間で組織よりケラチノサイトが出現し、それより心臓由来線維芽細胞が出現する。約1週間でコンフルエント近くに達し、数代継代した後凍結保存し iPSCs 誘導用とする。

手術で得られた患者皮膚組織(2x5mm、厚さ 2-3mm)を 抗生剤で十分に洗浄した後、1mm 角に細切し、培養皿に付着させる。組織より分泌される体液をのり替わりにし、約20分乾燥後に20%FBS/DMEMにペントシリン/ストレプトマイシンを加えた培養液にて培養を開始する。約10日間で組織よりケラチノサイトが出現し、それより心臓由来線維芽細胞が出現する。約1週間でコンフルエント近くに達し、数代継代した後凍結保存し iPSCs 誘導用とする。

4. 研究成果

iPS 細胞誘導の概念として2つのコンセプトが存在する。1つは、増殖性を有する体細胞であれば、基本的にiPS細胞誘導が可能であるとするストカスティックモデルと、ある特殊な細胞のみiPS細胞誘導が可能と考えるエリートモデルで

ある(図 1)。

購入した間葉系細胞を用いたiPS細胞の場合、京都iPS研究所より発表されたプロトコルによりヒトiPS細胞作製は問題なく可能である。一方患者由来初代培養間葉系細胞を用いた場合皮膚由来であれば効率は極めて悪いが何とかiPS細胞を誘導可能である。メイズ手術により摂理剥離された心房組織より分別培養した心臓由来線維芽細胞は、その形態、GFPを用いた遺伝子導入効率など、少なくとも皮膚由来線維芽細胞のそれらに比べて、特段劣ることはないが、iPS細胞誘導されることなく、すべての細胞が老化し死する(図 2)。

The Concepts of the iPS cells Reprograming

Stochastic model: any somatic cell capable

Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation.
Yamanaka S. *Nature*. 2009 Jul 2;460(7251):49-52.

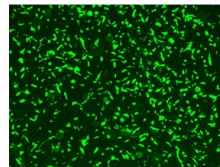
Elite model: existence of specific cell ex: muse cell?

Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts.

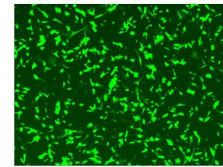
Wakao et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jun 14;108(24):9875-80.

図 1

GFP Transfection



Dermal Fibroblasts

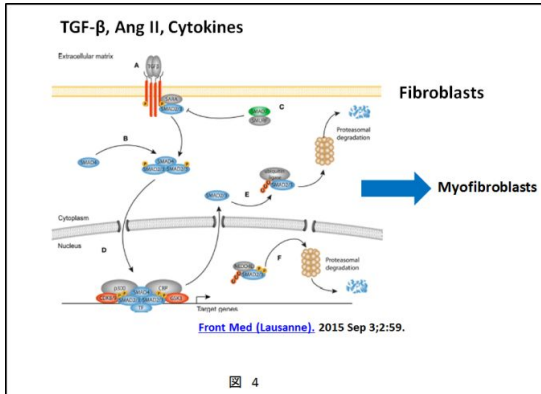
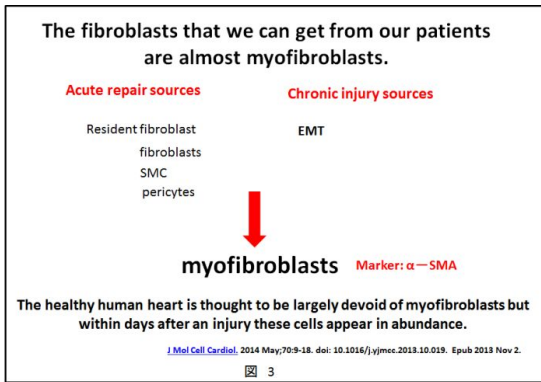


Cardiac Fibroblasts

There is no significant difference between them in the transfection technique.

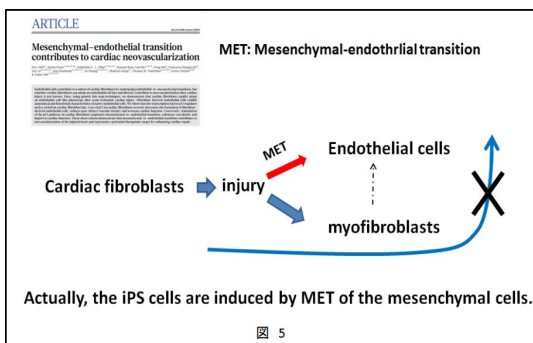
図 2

その為、患者心臓由来線維芽細胞の遺伝子プロファイルを確認したところ、Myofibroblasts(筋線維芽細胞)が、極めて高発現していることが判明した。筋線維芽細胞は、SMAをマーカーとし、周囲の急性・慢性炎症の結果生じる病態心で見られる間葉系細胞の終末スポットである(図 3、4)。



興味深いことに、患者皮膚由来線維芽細胞の SMA 発現は高くなく、筋線維芽細胞への変化はほとんど生じていないことが判明した。いくつかの患者心臓由来線維芽細胞を確認したが、すべて患者で筋芽細胞は高発現しており、病態心から切離された組織を用いた線維芽細胞分別においては、ほぼ筋線維芽細胞であることが判明した。

Ubil らは、心筋虚血による心筋障害を誘発した際、心臓線維芽細胞の一部が、MET (Mesenchymal Epithelial Transition) を介して内皮細胞化することを証明し、その際心臓線維芽細胞の一部が筋線維芽細胞に変化するが、筋線維芽細胞から内皮細胞変化



はほとんど生じないとした。実は、間葉系細胞の iPS 細胞誘導も MET を介して起こる。もしそうであれば、筋線維芽細胞からの iPS 細胞誘導は極めて困難である (図 5)。

加えて、最近の論文では、山中 4 因子は、遺伝子導入後間葉系の主要遺伝子の発現を減弱させることを示しているが、少なくとも筋線維芽細胞を用いた場合、現在のプロトコールでは、間葉系の主要遺伝子の発現の減弱は認められず、これらの要因が重なり、筋線維芽細胞からの iPS 細胞誘導は極めて困難である。

5. 主な発表論文等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井口篤志 (Iguchi Atsushi)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：90222851

(2) 研究分担者

道本 智 (Domoto Satoshi)
埼玉医科大学・医学部・助教
研究者番号：00649337

千本松孝明 (Sembonmatsu Takaaki)

埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：70216563

(3) 連携研究者

()

研究者番号：