

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670594

研究課題名(和文) iPS細胞由来心筋細胞を用いた三次元心筋組織構築による次世代心筋再生治療法の開発

研究課題名(英文) In vivo and vitro noble differentiation of induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes

研究代表者

宮川 繁 (MIYAGAWA, Shigeru)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任准教授(常勤)

研究者番号：70544237

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)：iPS細胞から成熟した心筋細胞へ分化させることは、細胞治療の効果を促進させることが期待されている。これまでの心筋分化方法では、未成熟な胎児型心筋細胞までは可能であったが、それらを心臓表面に移植させることで、未熟細胞が成熟細胞へ分化することが可能である結果が得られた。さらに培養条件の検討により、さらに生体内を模擬したような拍動条件下や分化に必要なタンパク因子を添加させることでも成熟の促進をえることができると考えられた。成熟した心筋と移植心臓との生着が認められた結果からも、分化成熟の段階で、拍動条件などの生体内を模した環境を与えることが成熟を促進し、細胞治療の効果増強を期待できると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The established differentiation of cardiomyocytes derived from iPS cells are expected to result in better efficacy of cell transplantation therapy. The differentiating cardiomyocytes were transplanted onto adult nude rate hearts. In the transplanted iPS cardiomyocytes in vivo, cardiac specific marker was much more expressed than the cardiomyocytes cultured in vitro. This result suggests that the environment that imitates the condition of cardiomyocytes differentiation promote the differentiation of iPS-CMs. The mechanical stretch modulated cell alignment and maturation gene expression in vitro. The differentiation of cardiomyocytes derived IPS cells might be promoted in vitro by mechanical stretching.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：iPS細胞 心不全 心筋細胞

1. 研究開始当初の背景

近年の心不全治療の進歩にも拘わらず、薬物治療抵抗性の重症心不全に対する再生医療として、細胞移植が注目されている。骨髄細胞や筋芽細胞を用いた細胞治療の臨床研究が実施され、一定の効果が認められたが、その効果は不十分である。その原因として、移植された細胞が心筋へ分化がみとめられないことが示唆されている。iPS細胞の発見に伴い、*in vitro*での心筋細胞の生成が可能となり、新たな移植細胞ソースとして期待されている。細胞移植の効果を上げるためには、移植された細胞が生体内で生着することが望まれる。これまでに、心筋細胞が移植される拍動する環境でのiPS細胞由来心筋細胞の分化についての検討はされてこなかった。

2. 研究の目的

iPS細胞由来の心筋細胞が、移植される環境下で培養することにより、通常の培養環境に比べて、分化が促進されることを仮説とし、さらに、生体内に移植されたiPS細胞由来心筋細胞が、同様の環境下で、分化することを分子病理学的に検討した。

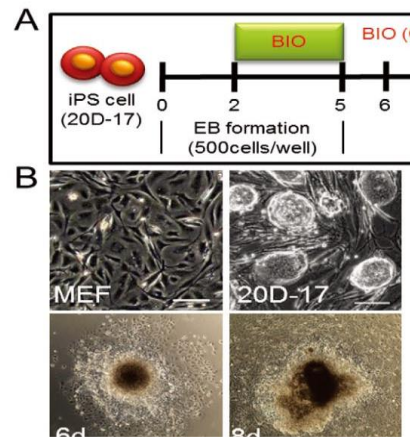
3. 研究の方法

iPS細胞(20D-17, 256H18)を培養、分化誘導し、拍動を確認した心筋細胞を様々な、培養条件を設定し、心筋細胞の成熟度を評価した。

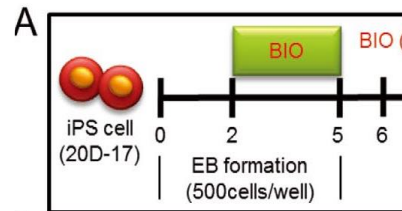
- (1) 拍動が確認されたEB体を浮遊培養し、分化誘導を促進させる目的にHGF、GH、IGF-1 (HGF, 10ng/ml; GH, 20ng/ml; IGF-1, 20ng/ml)を添加し、さらに1週間の培養を継続した。添加因子により分化に対する影響を病理学的に評価した。
- (2) 拍動が確認されたEB体を回収し、コラーゲン膜上に播種し、陰圧により、機械的伸展刺激(FX-4000, frequency, 1.0Hz; Max%, 30%; Cycle, 5000)を加えた環境での培養を1週間追加した。拍動条件下での培養が分化に与える影響について、病理学的に評価した。
- (3) 同様のEB体を温度感応性培養皿に播種し、16日後に細胞をシート状で回収した。6週齢のヌードラットの心臓表面に心筋シートを移植した。移植2週間後に心臓を摘出し、移植されたiPS細胞由来心筋細胞の分化、成熟の程度を評価した。

4. 研究成果

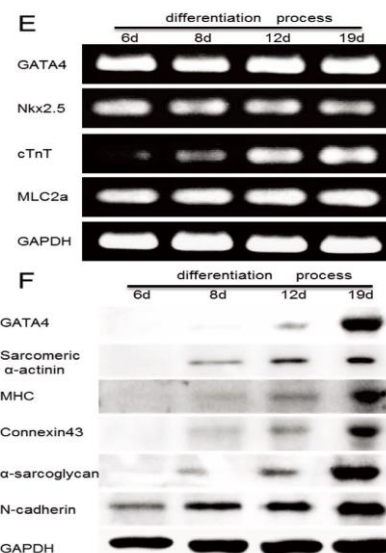
iPS細胞由来心筋細胞は分化誘導後、5日目までは拍動が確認できなかったが、浮遊培養6日目以降で徐々に拍動するEB体数が増加することが確認された。



EB体内での拍動範囲の経時的に拡大することが確認された。

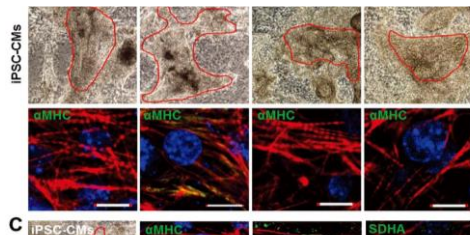


心筋特有の遺伝子発現もまた、培養時間の延長とともに、発現量が増え、結果、心筋の構成タンパクも増加していることが確認された。

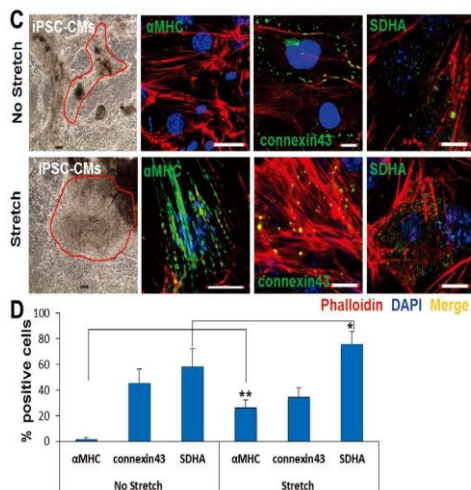


これらの心筋へ分化していることが確認された未成熟な心筋細胞を用いて、分化後の培養条件の違いによる、心筋細胞成熟に与える影響を検討することにした。

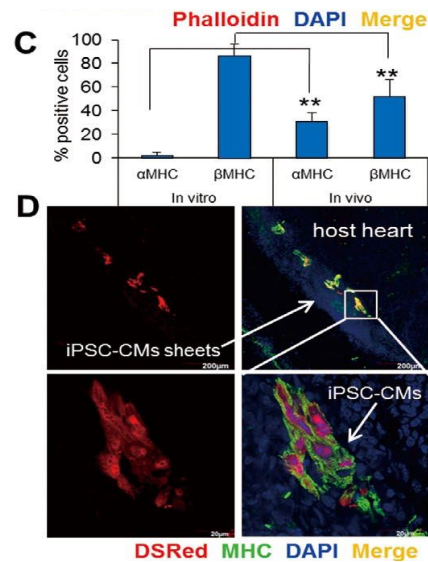
- (1) 成熟した心筋細胞のマーカーとして α MHC を評価したところ、IGF-1 添加培養条件において、無添加の細胞と比較して、成熟が得られることが判明した。しかし、HGF や GH の添加群では、心筋成熟へ影響は認められなかった。



- (2) 機械的伸展刺激を加えた細胞群では、拍動する細胞の範囲が広がる傾向にあり、病理学的にも成熟が促進されていることが確認された。伸展刺激を加えなかった細胞群と比較しても、 α MHC やミトコンドリア成熟 SDHA の陽性細胞数が有意に増加していた。



- (3) 生体内に移植された iPS 細胞由来心筋細胞は細胞外基質への接着因子が強く発現し、それらを反映して移植心臓への良好な生着を示した。さらに、生着した心筋細胞には単純な培養条件下では認められなかった α MHC の高発現が認められ、胎児型心筋細胞から成熟型心筋細胞への分化の促進が起こったと考えられた。



小動物の心臓への移植の結果から、生体内で成熟と細胞の生着に関連が示された。これらの結果から、再生医療を目的とした細胞移植前に心筋細胞への成熟させることが、細胞の生着、生存を延長させ、より高い治療効果を得ることが期待される。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

- 武田真季、宮川繁、福嶋五月、齋藤充弘、増田茂夫、澤芳樹 他
ヒト iPS 細胞由来三次元心筋組織を用いた薬剤等毒性評価法の検討
第 14 回日本再生医療学会 パシフィコ横浜 神奈川県 横浜市 平成 27 年 3 月 21 日

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等:特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮川 繁 (MIYAGAWA, Shigeru)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任准教授（常勤）
研究者番号：70544237

(2) 研究分担者

戸田 宏一 (TODA, Koichi)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：40379235

吉岡 大輔 (Yoshioka, Daisuke)
大阪大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40645959

齋藤 哲也 (Saito, Tetsuya)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教
研究者番号：10644891