

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670595

研究課題名(和文) マイクロRNAによる心筋前駆細胞への分化誘導制御

研究課題名(英文) Challenges for derivation of cardiac progenitors with microRNA regulation

研究代表者

細山 徹 (HOSOYAMA, Tohru)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20638803

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)：本研究の目的は、心筋前駆細胞の新たな供給材料として発生学的に近縁な骨格筋前駆細胞(SMPC)の有用性について、マイクロRNAによる分化制御やSMPCの分化可塑性に焦点を当てて検証することである。本研究では、ヒトiPS細胞に由来するSMPCの集団EZスフィアがin vitroで多分化能を示すこと、さらにマウス梗塞心において心筋細胞へ分化し得ることを証明した。一方、SMPCにおけるmiR-1ファミリーの阻害では分化能に影響は見られなかった。これらの結果は、EZスフィアが骨格筋と心筋の中間前駆細胞として有用であることを示唆しており、今後はEZスフィアにおけるマイクロRNA制御についての研究が期待される。

研究成果の概要(英文)：Specific Aim of this study was to clarify whether human induced pluripotent stem cell (hiPSCs)-derived skeletal muscle progenitor cells (SMPCs) can become novel cell supplier for cardiac progenitor cells (CPC). In this study, we particularly focused on the microRNA-associated regulation and the multipotency of SMPCs. As a result, we demonstrated that hiPSCs-derived SMPCs, termed EZ spheres, potentiate multi-differentiation capacities and transplanted EZ spheres can give rise to cardiomyocytes in mouse infarcted heart. While, an inhibition of miR-1 family did not affect the multipotency of EZ spheres. Taken together, this study clearly demonstrated that hiPSCs-derived EZ spheres is valuable cell source as a bipotent progenitor cells to differentiate into both skeletal and heart muscles, and it is expected that microRNA-mediated regulation in the multipotency of EZ spheres in future studies.

研究分野：再生医学

キーワード：ヒト多能性幹細胞 心筋前駆細胞 骨格筋前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

心筋前駆細胞 (CPC) は、心筋細胞のみならず血管内皮細胞や平滑筋細胞へも分化し得る「限定的分化可塑性」を有する未成熟な細胞であり、CPC による細胞移植療法は心不全治療法として期待されている。しかし、成体に存在する CPC はごく僅かであり、患者の心臓から移植に必要な量の CPC を得ることは実質不可能である。胚性幹細胞 (ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、CPC のような患者由来希少細胞の大量調整を可能にする細胞であり、当該分野において大いに期待されている。しかし、ヒト多能性幹細胞から CPC を大量に調整する方法論は確立されているとは言い難く、新たな方策が必要である。

多能性幹細胞からの CPC 誘導には、発生を模した細胞成長因子の段階的添加による誘導方法や、低分子化合物による誘導方法などが用いられている。さらに近年では、心筋発生におけるマクロ RNA 制御が注目されており、CPC 誘導の新たな方法として期待されている。しかし現状は、CPC の誘導効率を劇的に向上させる決定的なマイクロ RNA 分子の同定には至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、発生学上近縁な骨格筋前駆細胞と CPC を比較することにより、CPC 分化に必要なマスターマイクロ RNA を探索し、多能性幹細胞のみならず他の細胞種からの CPC 誘導を可能にする方法論を確立することを研究目的とした。特に、CPC とは別種の前駆細胞から CPC を誘導し得る可能性について検証し、CPC の大量調整を可能にする方法について検証する。iPS 細胞の発見からも確かなように、完全に分化・成熟した細胞であっても適切な因子を働かせることにより全く別種の細胞種へ分化転換させることは可能であり、本研究では、体細胞よりも細胞成熟度やクロマチン状態がより未熟な状態にある組織幹・前駆細胞に注目し、同定した CPC 特異的マイクロ RNA を用いた分化転換法を確立することを目指す。本法が確立されれば、細胞移植に必要な大量の CPC の獲得や、培養操作に特別な技術を必要とするヒト多能性幹細胞の培養を毎度経ることなく、未分化状態で維持した組織幹・前駆細胞を細胞ソースとして用いることができる極めて有効な方法となり得る。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞株 201B7 は、RIKEN バイオリソースセンターから入手した。201B7 をフィーダー細胞 (マウス胎児線維芽細胞:MEF) に播種し、ReproStem (リプロセル社) で未分化状態を維持した。2-3 継代維持した後に、フィーダー非依存性の培養法に変更した。この際に用いた培地は ReproStem2 である。ま

た、性質変化を考慮し全ての試薬から抗生物質を抜いたものを用いた。培地交換は毎日行い、培養中に分化を開始してしまった iPS 細胞コロニーは顕微鏡下でのスクラッチ法により除去した。

(2) ヒト iPS 細胞からの心筋前駆細胞の分化誘導

ヒト iPS 細胞からの心筋前駆細胞の誘導は、Lian らの方法を参考にした。本法は、未分化状態のヒト iPS 細胞を GSK3 β inhibitor である CHIR99021 (Stemgent 社) と Wnt signaling inhibitor である IWP2 (Stemgent 社) を時期特異的に添加する手法であり GiWi 法と呼ばれる (Lian *et al.*, *Nat Protoc.* 2013: 引用文献 1)。本法により、ヒト多能性幹細胞から 90-95% の効率で心筋細胞が誘導可能であるとされ、本実験ではその途中の段階で細胞を回収し CPC とした (IWP2 添加 5 日後に細胞を回収)。CPC の確認は、Nkx2.5 発現に対する免疫蛍光染色により行った。

(3) ヒト iPS 細胞からの骨格筋前駆細胞の分化誘導

未分化状態で維持したヒト iPS 細胞 (201B7) コロニーを酵素処理 (TrypLE: Life Technologies 社) により培養皿から剥離し、Poly-HEMA (Sigma 社) コーティングしたフラスコにコロニーを移して浮遊培養を開始した。この際、100 ng/ml の bFGF と EGF を含む StemLine 培地 (Sigma 社) を骨格筋前駆細胞への分化誘導培地として用い、スフィアを形成し発達したヒト iPS 細胞スフィア-EZ スフィアは一週間に一度の頻度でメカニカルチョッピング法により継代した (Hosoyama *et al.*, *Stem Cells Transl Med.* 2014: 引用文献 2)。本法により 5 継代目に多数の骨格筋前駆細胞がヒト iPS 細胞より誘導される。

(4) マウス心筋梗塞モデルの作製

雄マウス (C57BL/6: 5-7 週齢) を麻酔および呼吸管理下で開胸し、冠動脈左前下行枝 (LAD) をナイロン糸で結紮することで左室前壁部に梗塞を誘発した (Suzuki, Li *et al.*, *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007: 引用文献 3)。LAD 結紮前および 4 週間後に心エコーにより左室機能変化を確認し、左室駆出率が 30% 前後まで落ちた個体を陳旧性心筋梗塞モデルとして細胞移植実験に用いた。

(5) 梗塞心への細胞移植

マウス心筋梗塞モデルの梗塞心への細胞移植は麻酔・呼吸管理下で行い、免疫抑制剤サイクロスポリン A (0.2 mg/20 g: オリブオイルで希釈) を細胞移植の前日から屠殺までの間腹腔内投与した (毎日)。細胞移植 3 週間後にマウスを屠殺し、心臓の組織切片を作製して移植細胞の生着について検証した。検証には、ヒト細胞特異的抗原 (抗 human

Nuclei 抗体: Millipore 社) および抗 α -Actinin 抗体(Cell Signaling Technology 社)を用い、移植細胞の梗塞心における生着性および心筋細胞分化能を評価した。

(6) マイクロ RNA 発現抑制

骨格筋前駆細胞における miR-1 ファミリーの抑制には、microRNA family inhibitor (Exiqon 社)を用いた。ViaFect (Promega 社)を用いたトランスフェクション法により miR-1 ファミリーインヒビターを増殖中の骨格筋前駆細胞に導入し、形態学的な変化を顕微鏡下で観察した。

4. 研究成果

(1) ヒト iPS 細胞からの心筋前駆細胞の誘導

ヒト iPS 細胞株 201B7 より GiWi 法を用いて心筋前駆細胞の誘導を試みた (Lian *et al.*, *Nat Protoc.* 2013: 引用文献 1)。本法は、多能性幹細胞から心筋細胞を誘導する目的で開発された為、本研究では誘導の途中で細胞を回収し CPC とした。結果、GiWi 法により Nkx2.5 陽性の多数の心筋前駆細胞が誘導された (図 1)。

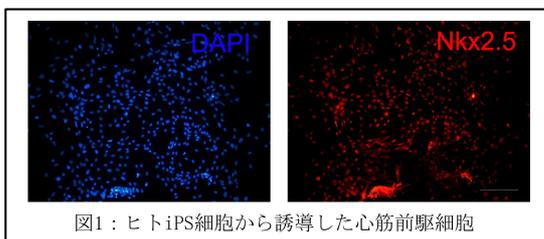


図1: ヒト iPS 細胞から誘導した心筋前駆細胞

(2) ヒト iPS 細胞株 201B7 からの骨格筋前駆細胞の分化誘導

これまでに我々は、ヒト多能性幹細胞から効率良く骨格筋前駆細胞を分化誘導する方法を開発し報告してきた。しかし、ヒト多能性幹細胞は細胞株によって特定の細胞への分化能が異なり、とりわけ iPS 細胞では導入因子や導入方法の影響により株間のバラツキが大きいとされる。我々の開発した EZ スフィア法は、これまでも様々なヒト iPS 細胞株でその誘導効率が検証されており、比較的バラツキが小さいと結論付けてきた (Hosoyama *et al.*, *Stem Cells Transl Res.* 2014: 引用文献 2)。しかしながら、これまでに用いてきた iPS 細胞株はいずれも Wisconsin 大学のトムソン博士らの方法で樹立された株であり (Yu *et al.*, *Science.* 2007: 引用文献 4) いわゆる山中 4 因子の導入によって樹立された株でも同法によって骨格筋前駆細胞が誘導可能かは明らかではない。そこでまず、山中 4 因子で樹立された 201B7 株 (Takahashi *et al.*, *Cell.* 2007: 引用文献 5)

を用いた骨格筋前駆細胞の誘導を試みた。更に、FACS 解析を行い EZ スフィアで発現している表面抗原群の同定を試みた。

山中 4 因子導入で樹立された 201B7 株は、EZ スフィア法によって従来通り効率よく骨格筋前駆細胞へ分化し、接着培養に移し更に培養することで最終分化形態である筋管細胞へも分化した (図 2A)。この結果は、株間で分化誘導効率の若干のバラツキがあるものの EZ スフィア法の普遍性を示しており、本法の妥当性が証明された。

次に我々は、EZ スフィアの表面抗原群を明らかにするために FACS 解析を行った。解析に用いた表面抗原群は、CD34、CD45、CD73、CD90、CD105、CXCR4 である。結果として、201B7 由来 EZ スフィアは CD90/CD105/CXCR4 を高発現しており、血管内皮マーカー (CD34) や血球系細胞マーカー (CD45) の発現は認められなかった。これらの結果は、EZ スフィアが間葉系細胞の集団であることを示しているが、一方で CD73 の発現は認められなかった為、典型的な間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells) とは異なると推察される (図 2B)。

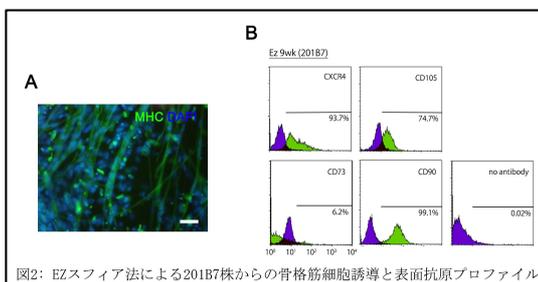


図2: EZ スフィア法による 201B7 株からの骨格筋細胞誘導と表面抗原プロファイル

(3) ヒト iPS 細胞由来骨格筋前駆細胞の多分化能

骨髄間葉系幹細胞に代表される間葉系細胞は、骨や脂肪、骨格筋などに分化し得ると考えられている (Dezawa *et al.*, *Science.* 2010: 引用文献 6)。先の FACS 解析により、201B7 由来 EZ スフィアが間葉系の細胞であることが示唆された為、EZ スフィアの多分化能を検証した。

まず、それぞれの前駆細胞マーカーの遺伝子発現を解析したところ、EZ スフィアが *NESTIN* や *RUNX2* などの神経前駆細胞および骨前駆細胞マーカーの発現が認められ、一方で脂肪前駆細胞マーカーである *PPAR γ* 発現は認められなかった。続いて、介在ニューロン、骨細胞、脂肪細胞への分化を誘導したところ、遺伝子発現パターンの正当性を示すように EZ スフィアが神経細胞および骨細胞へと分化した。

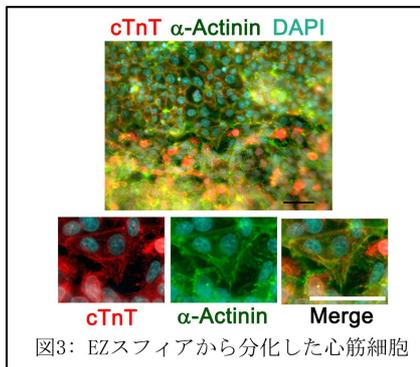


図3: EZスフィアから分化した心筋細胞

次に、心筋前駆細胞のマーカである Nkx2.5 の発現を免疫蛍光染色によって確認したところ、一部の細胞集団で Nkx2.5 発現が認められた。そこで、培養皿に播種した EZ スフィア由来細胞に心筋細胞分化の誘導を施したところ、心筋型トロポニン T 陽性・ α -アクチニン陽性の心筋細胞が誘導された (図 3)。これらの結果を総合すると、EZ スフィア法により 201B7 から誘導された骨格筋前駆細胞を含む EZ スフィアは、骨格筋、心筋、神経、骨へ分化可能な多能性スフィアであると推察される。

(4) マウス陳旧性心筋梗塞モデルへの EZ スフィアの移植

左室前壁に陳旧性心筋梗塞を施したマウスの不全心へ EZ スフィアを移植し、その生着性および心筋への分化能を検証した。

EZ スフィアは、LAD 結紮 4 週間後の梗塞心へ移植し、3 週間後にヒト特異的抗原・ α -アクチニン発現により生着性および心筋分化について検証したところ、マウス梗塞心におけるヒト細胞の存在を確認し、またその幾つかの細胞では α -アクチニンの発現を認めた (図 4)。このことは、梗塞心へ移植した EZ スフィアが心筋細胞へ分化し得ることを示唆している。

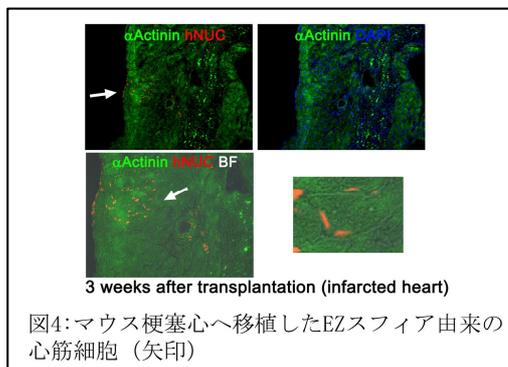


図4: マウス梗塞心へ移植したEZスフィア由来の心筋細胞 (矢印)

(5) 骨格筋前駆細胞における miR-1 ファミリーの抑制効果の検証

当初の研究計画では、ヒト iPS 細胞由来の心筋前駆細胞と骨格筋細胞におけるマイクロ RNA 発現の比較を行うことで、心筋細胞分化のマスターマイクロ RNA を同定する予定であったが、201B7 由来の EZ スフィア内

に心筋前駆細胞が既に含まれ、実際に in vitro および in vivo において心筋細胞への分化能が確認されたことから、計画を変更し心筋細胞分化に必須とされる miR-1 ファミリー (Zhao et al., Cell. 2007: 引用文献 7) の阻害実験を行った。しかしながら、骨格筋前駆細胞において miR-1 ファミリーを阻害しても骨格筋細胞への分化能へ影響は認められず、今後、miR-1 ファミリーの過剰発現実験が必要であると予想される。

【結論と考察】

本研究により、ヒト iPS 細胞から普遍的に骨格筋前駆細胞が誘導可能であることが明らかとなり、また、EZ スフィアが様々な細胞系譜へと分化し得る多能性スフィアの性質を有していることが示された。

ヒト多能性幹細胞は、理論上全ての細胞系譜の細胞ソースとなり得ると考えられるが、未分化を維持しての培養は決して容易ではなく、また維持にかかるコストも無視できない。我々が本研究で見出した多能性 EZ スフィアは、浮遊状態で大量に培養でき、培養方法も極めて簡便であるために、心筋細胞や骨格筋細胞の中間細胞体として期待される。今後、より精度の高い培養方法が確立されれば再生医療分野における有用性は高い。

EZ スフィアは、梗塞心へ直接移植することにより心筋細胞へ分化し得ることが示されたが、今後は、不整脈の発生や心機能回復効果の検証を進めていく必要がある。

一方、本研究からは心筋細胞をマスター制御するマイクロ RNA の同定には至らなかったが、本系がより成熟したものとなった際には心筋前駆細胞と骨格筋前駆細胞とのマイクロ RNA 発現プロファイルの網羅的比較が可能となり同定も可能となると期待される。

【引用文献】

- 1: Lian X, Zhang J, Azarin SM, Zhu K, Hazeltine LB, Bao X, Hsiao C, Kamp TJ, Palecek SP. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc.* 2013. 8: 162-175.
- 2: Hosoyama T, McGivern J, Van Dyke J, Ebert AD, Suzuki M. Derivation of Myogenic Progenitors Directly from Human Pluripotent Stem Cells using Sphere-based Culture. *Stem Cells Transl Med.* 2014. 3: 564-574.

- 3: Suzuki R, Li TS, Mikamo A, Takahashi M, Ohshima M, Kubo M, Ito H, Hamano K. The reduction of hemodynamic loading assists self-regeneration of the injured heart by increasing cell proliferation, inhibiting cell apoptosis, and inducing stem-cell recruitment. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007. 133: 1051-1058.
- 4: Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 2007. 318: 1917-1920.
- 5: Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007. 131: 861-872.
- 6: Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, Yoshihara T, Hoshino M, Takeda S, Ide C, Nabeshima Y. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science.* 2005. 8; 309: 314-317.
- 7: Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, Tsuchihashi T, McManus MT, Schwartz RJ, Srivastava D. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell.* 2007. 129: 303-317.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

なし

〔学会発表〕(計2件)

1: 細山 徹、佐村 誠、工藤智明、鈴木正寿、濱野公一 「骨格筋前駆EZスフィアの多分化能と心不全治療への応用の可能性」精神・神経疾患研究開発費 武田班平成26年度班会議(招待講演) 2014年12月3-4日(東京・千代田区)

2: Hosoyama T, Samura M, Kudo T, Suzuki M, and Hamano K. "Derivation of Multipotent Spheres from Human Pluripotent Stem Cells for Cell-based Therapy in Heart and Skeletal Muscle Diseases". Keystone Symposia "Growth and Wasting in Heart and Skeletal Muscle". 2014年1月26-31日 ニューメキシコ州サンタフェ市(米国)

〔図書〕(計0件)

なし

〔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〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

細山 徹 (HOSOYAMA, Tohru)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20638803

(2)研究分担者

李 桃生 (TAO-SHENG, Li)
長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授
研究者番号：50379997