

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670598

研究課題名(和文)新規作製法による組織特異的幹細胞の創出と再生医療への応用

研究課題名(英文)Generation of cardiac progenitor cells by partial reprogramming

研究代表者

李 桃生 (LI, Tao-Sheng)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授

研究者番号：50379997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、部分的な初期化(Partial Reprogramming)という新たなコンセプトに基づき、体細胞から限定的な分化能を有する心筋幹細胞の作製を試みました。その結果、心臓組織由来細胞および皮膚線維芽細胞に二つの特定遺伝子を導入することにより、心筋幹細胞に特異的遺伝子の誘導が認められた。また、二つの特定遺伝子を導入された細胞から、心筋、内皮、平滑筋細胞への分化が認められたが、脂肪や軟骨細胞への分化は観察されなかった。部分的な初期化により心筋幹細胞の作製が可能と思われた。

研究成果の概要(英文)：Fully reprogramming of adult tissue cells was well known to be able to establish iPS cells. It has also reported that cardiomyocytes could be generated from fibroblasts by direct reprogramming. We tried to generate cardiac stem/progenitor cells by "partially reprogramming", a new concept of cell reprogramming. Human skin fibroblasts and cardiac tissue-derived cells were virally transfected with various combinations of transcription factors. Cardiac stem cells were identified by the expression of both common stem cells marker of c-kit and early cardiac specific markers (Gata-4 and Tbx5) in these fibroblasts within 2 weeks after the transfection with two defined factors. These generated cardiac stem cells could differentiate into VE-cadherin+ endothelial cells, SMA+ smooth muscle cells, and troponin-T+ cardiomyocytes, but we failed to induce into beating cardiomyocytes in vitro. Cardiac stem/progenitor cells could be generated from fibroblasts by two defined factors.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：部分的な初期化 心筋幹細胞

1. 研究開始当初の背景

多能性幹細胞 iPS 細胞は、体細胞からの完全な初期化(Full Reprogramming)によって作製される。この iPS 細胞は、胚性幹(ES)細胞と同様に多分化能を有するため、そのまま生体内に移植すると悪性畸胎腫形成の危険性があり、臨床応用に際しては疾患に応じて特定の細胞へ分化誘導し、成熟した細胞のみを分離純化して用いることが不可欠であるという欠点を有する。

一方、臓器特異的な体性幹(前駆)細胞は ES 細胞や iPS 細胞のように多分化能をもたず、該当臓器の細胞にのみ限定的に分化する。そのため、分化誘導・分離純化の必要なしにそのまま臓器に移植しても畸胎腫形成の危険性はなく、既に世界中で臨床応用が進んでいる。しかし、患者本人から採取できる幹細胞の数が少量に限られるため、治療効果は必ずしも十分とは言えない。再生医療において、個々の患者での再生に必要とされる臓器は限定されており、必ずしも多分化能を有する幹細胞を必要としない。患者の疾患に応じて、限定的な分化能を有する臓器特異的な幹細胞が作製できれば、iPS 細胞のように分化誘導・分離純化の操作を行わずに、そのまま再生医療に利用できると思われる。

2. 研究の目的

本研究では、部分的な初期化(Partial Reprogramming)という新たなコンセプトに基づき、患者の体細胞から限定的な分化能を有する組織特異的幹細胞(心筋幹細胞)の作製を試み、作製した組織特異的幹細胞そのままでの再生医療への応用の効果と安全性を検証する。

3. 研究の方法

1) 心筋幹細胞の作製と特性の検証

ヒト心臓および皮膚生検組織から心筋幹細胞の作製：

心臓および皮膚生検組織は、倫理委員会の許可と患者の同意を得て、心臓外科手術を施行する際に採取する。生検組織から心臓組織由来体細胞および皮膚由来線維芽細胞を培養増殖し、以下の遺伝子を導入して、心筋幹細胞の作製を試みる。

ア：心筋幹細胞に多く発現している遺伝子(Isl-1、c-kit、Sca-1 など)。

イ：心筋細胞の早期形成に必要な遺伝子(Nkx2.5、GATA-4、MEF-2c など)。

ウ：内皮細胞の早期形成に必要な遺伝子(Flk-1、Flk-4 など)。

作製した心筋幹細胞の特性の検証：

以下の方法で心筋幹細胞の特性の有無を確認する。

ア：心筋細胞、平滑筋細胞、及び内皮細胞への分化効率。

イ：分化した心筋細胞としての収縮機能。

ウ：多分化能に関連する遺伝子の発現。

エ：他臓器(肝臓、脂肪、骨・軟骨、神経など)細胞への分化。

2) *In vivo* 実験により作製した心筋幹細胞の心筋再生効果と安全性の確認

SCID マウスを用いて心筋梗塞モデルを作製し、部分的に初期化により作製された心筋幹細胞を心筋梗塞に注入する。以下の方法により、心血管再生の効果および安全性について評価する：

ア：心機能(心エコー検査により)。

イ：心筋梗塞面積及び心筋細胞のアポトーシス。

ウ：移植した心筋幹細胞から心筋細胞、平滑筋細胞、及び内皮細胞への分化効率。

エ：細胞を移植した領域での腫瘍や石灰化の形成など異常所見の有無。

4. 研究成果

1) 心臓および皮膚生検組織から心臓組織由来細胞および皮膚由来線維芽細胞を培養増殖した¹⁾。継代培養 2 代目の細胞を親細胞として、それぞれ心臓幹細胞に多く発現している遺伝子 (Isl-1, Sca-1, ...)、心筋細胞の早期形成に必要な遺伝子 (Nkx2.5, GATA-4, ...)、内皮細胞の早期形成に必要な遺伝子 (Flk-1, Flk-4, ...)、および幹細胞関連遺伝子 (Sox2, Oct3/4, ...) の計 24 種類の候補遺伝子を種々の組み合わせにして、細胞へ導入することによる心臓幹細胞の作製を試みた。その結果を図 1 に示す。

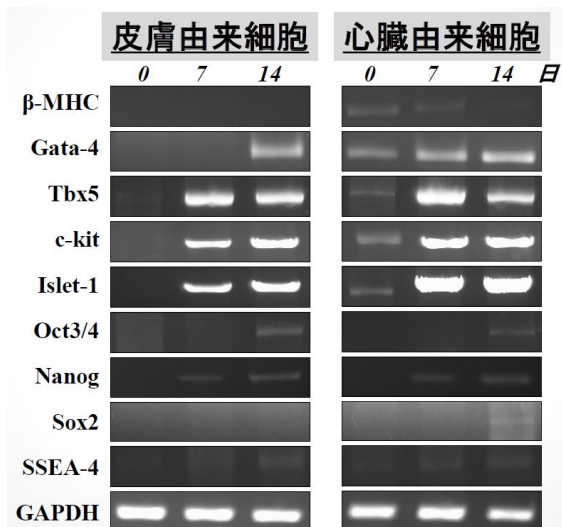


図 1: 遺伝子導入前後の皮膚および心臓組織由来細胞における幹細胞関連遺伝子発現の経時的変化。二つの特定遺伝子を導入後 7, 14 日目に親細胞に Gata4、Tbx5、c-kit、Isllet-1 など心筋幹細胞関連遺伝子の発現が誘導された一方で、Oct3/4、Nanog、Sox2、SSEA-4 など幹細胞の多能性維持に関連する因子の発現はほとんど認められなかった。

2) 皮膚および心臓組織由来細胞にそれぞれ二つの特定遺伝子を導入後 4 週目に、免疫染色でその細胞の特性を調べた。また、皮膚および心臓組織由来細胞に二つの特

定遺伝子を導入後 4 週目の細胞を用いて、それぞれ心筋、内皮、平滑筋細胞への分化誘導を行い、分化誘導 5 日後に免疫染色でその分化効率を調べた。その結果を図 2 に示す。

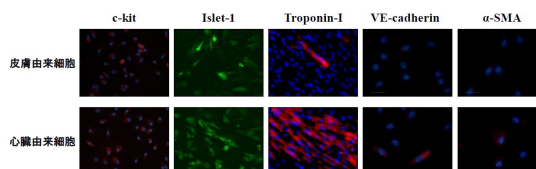


図 2: 皮膚および心臓組織由来細胞に二つの特定遺伝子導入により作製した心筋幹細胞の特性解析。過去の研究で心筋幹細胞の同定に良く使われるマーカー c-kit と Isllet-1 の発現がそれぞれ約 30 ~ 60% の陽性率で認められた。二つの特定遺伝子を導入した心臓組織由来の細胞からは効率よく心筋細胞 (Troponin-1 陽性) へ分化したが、同じ遺伝子導入した皮膚由来細胞では心筋細胞への分化効率が明らかに低かった。また、遺伝子を導入した心臓組織由来の細胞からは約 10% の効率で内皮細胞 (VE-cadherin 陽性) や平滑筋細胞 (α-SMA 陽性) への分化は認められたが、同じ遺伝子導入した皮膚由来細胞では内皮細胞や平滑筋細胞への分化効率が極めて低かった (<2%)。

今後は心筋梗塞モデルを用いて、二つの特定遺伝子導入により作製された心筋幹細胞を梗塞心筋内に注入し、その心筋再生効果と安全性を調べる予定です。

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 4 件)

1. Hensley MT, de Andrade J, Keene B, Meurs K, Tang J, Wang Z, Caranasos TG, Piedrahita J, Li TS, Cheng K. Cardiac regenerative potential of cardiosphere-derived cells from adult dog hearts. *J Cell Mol Med*. 2015 Apr 9. doi: 10.1111/jcmm.12585. [Epub ahead of print] (査読あり)
2. Kurazumi H, Li TS, Takemoto Y, Suzuki R, Mikamo A, Guo CY, Murata T, Hamano K. Hemodynamic unloading increases the survival and affects the differentiation of cardiac stem cells after implantation into an infarcted heart. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2014;45(6):976-82. (査読あり)
3. Cheng K, Malliaras K, Smith RR, Shen D, Sun B, Blusztajn A, Xie Y, Ibrahim A, Aminzadeh MA, Liu W, Li TS, De Robertis MA, Marbán L, Czer LS, Trento A, Marbán E. Human cardiosphere-derived cells from advanced heart failure patients exhibit augmented functional potency in myocardial repair. *JACC Heart Fail*. 2014;2(1):49-61. (査読あり)
4. Xie Y, Ibrahim A, Cheng K, Wu Z, Liang W, Malliaras K, Sun B, Liu W, Shen D, Cho HC, Li T, Lu L, Lu G, Marbán E. Importance of cell-cell contact in the therapeutic benefits of cardiosphere-derived cells. *Stem Cells*. 2014;32(9):2397-406. (査読あり)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

李 桃生 (LI Tao-Sheng)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授
研究者番号：50379997

(2)研究分担者

なし

研究者番号：

(3)連携研究者

濱野 公一 (HAMANO Kimikazu)

山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60263787