

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04819

研究課題名(和文) 新しいヒトiPS細胞由来心筋特異的前駆細胞を用いた心臓再生治療戦略の開発

研究課題名(英文) Novel cardiomyocyte-fated progenitors from human iPS cells for cardiac regeneration

研究代表者

山下 潤 (Yamashita, Jun)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：50335288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：心臓再生は再生医療の主要なターゲットです。本研究では、移植後にも効率よく心筋細胞に分化し、移植された心臓に貢献しうる新しい心筋の前駆細胞(心筋の前段階の細胞)の探索を行いました。ヒトiPS細胞の分化過程においてCD82と呼ばれる分子を発現する細胞は、ラットやマウスへの移植後もほぼ全て(>95%)の細胞が心筋細胞へと分化することを確認し、論文として発表しました(Takeda, Cell Reports, 2018)。現在心筋梗塞モデルなどにおいて治療効果があるかを検討しています。新しい心臓再生治療の可能性を拓くものとして期待されます。

研究成果の概要(英文)：Heart is a main target for regenerative medicine. In this study, we aimed at discovering a novel progenitor cell population which can specifically differentiate into cardiomyocytes even under non-specific environments including heart tissue after cell transplantation. We found that CD82-positive cells during human iPS cell differentiation highly efficiently (>95%) gave rise to cardiomyocytes after transplantation to mouse/rat animal models (Takeda, Cell Reports, 2018). Currently, we are examining functional improvement of infarct hearts after the cell transplantation. This cell population would be a novel cell source for cardiac regeneration therapy.

研究分野：幹細胞生物学・再生医学・循環器内科学

キーワード：再生医療 発生・分化 細胞・組織 循環器・高血圧 移植・再生医療

1. 研究開始当初の背景

心臓は再生医療の重要なターゲットであり、心臓移植の代替となり得る真の心臓再生治療法の開発が期待されている。現在 iPS 細胞を用いた心筋再生に対する試みも盛んになされているが、いずれも「誘導純化した分化心筋細胞をシートや細胞塊等を用いて心臓へ移植する」という戦略を発展させたものにとどまっている。しかしそれだけで完全に心臓移植を代替できる保証はなく、二の矢、三の矢に相当する新規心臓再生戦略を開発しておく必要がある。

これまで細胞治療において最も成功し実績があるのは、造血幹細胞移植による造血機能の再構成であり、移植幹細胞が生体内の幹細胞プログラム全体を再構築することにより、初めて臓器機能の再生が可能となっている。骨髄と異なり一旦なくしてしまうことができない実質臓器である心臓では、幹細胞ではなく前駆細胞を用いて心臓組織構築プログラムの「部分再構築」を行うことが次善の策と考えられる。前駆細胞による新しい治療戦略は、現在の「分化細胞の外的供給によって心筋量を増やす」という単純な戦略の限界をクリアし、真の心臓再生を実現できる可能性がある。しかしながらこれまで、心臓系列細胞の表面マーカーに関しては広く中胚葉系に分化する細胞群のみで、心筋特異的な前駆細胞は報告されておらず、重要な研究ターゲットとされていた(Burridge, Cell Stem Cell, 2012, Review)。

研究代表者らはこれまで、以下に示すような ES 細胞及び iPS 細胞を用いた心血管細胞の分化再生に関する先端的研究を行ってきた。

1) Flk1 陽性細胞が心血管系細胞の共通の前駆細胞であることを世界に先んじて示した(Nature, 2000; FASEB J, 2005)。

2) iPS 細胞からの細胞分化論文を世界で最初に報告(Circulation, 2008)。マウス iPS 細胞からの系統的な心血管分化誘導。(Circulation誌 2008 年基礎科学部門第 1 位 Best Paper Award)

3) ヒト心筋細胞表面マーカー (VCAM1) を世界で最初に報告(PLoS One, 2011 年 8 月)。世界的なヒト心筋細胞表面マーカー同定競争で、海外 (VCAM1 と SIRPA: Nat Method; Nat Biotechnol, 2011 年 10 月)に先んじた(特許成立済)。

4) 多能性幹細胞由来心筋・血管内皮/壁細胞 3 種混合シート移植による心筋梗塞治療法(京都大学心臓血管外科学との共同研究)マウス ES 細胞から誘導した心筋及び血管細胞(内皮細胞及び壁細胞)を用いた 3 種混合シートを作製し、心筋-内皮細胞相互作用による血管新生作用の増強、壁細胞によるシート構造形成作用など複数種細胞を用いることの治療効果における新たな意義を示した(Stem Cells, 2012a)。

ヒト iPS 細胞においても、3 種混合細胞シートの作製とラット心筋梗塞モデルへの移植を行い、心機能回復に加え、再生心筋組織として梗塞巣面積の最大 44% を占める細胞生着を移植 4 週後に確認した(Sci Rep, 2014・米国特許出願済)。これらの技術を基盤として幹細胞の血管分化機構の解析(Blood, 2009; J Cell Biol, 2010; Blood, 2011(同誌表紙); Stem Cells, 2012b)やケミカルバイオロジーとの融合による化合物を用いた効率的な分化誘導や心筋再生治療薬開発研究(Biochem Biophys Res Commun, 2009)、分化時間の制御という全く新しい分化制御機構の報告(Cell Stem Cell, 2012)、CRISPR-Cas9 ゲノム編集システムを用いた簡便な遺伝子機能解析系の構築(Biochem Biophys Res Commun, 2014)など、多能性幹細胞の心血管分化再生に関して基礎から臨床応用へ至る広範な研究と成果を積み上げてきた。

これらの研究を背景に研究代表者は最近、ヒト iPS 細胞分化途上において、心筋への運命決定がなされ、心筋細胞に特異的に分化する新たな前駆細胞分画を細胞表面マーカー CD82 により同定することに成功した。世界的に発見が渴望されていた心筋特異的な前駆細胞の同定・誘導・純化にヒト細胞においていち早く成功したことにより、従来のアイデアの限界を打ち破る新規次世代心臓再生治療法の開発に乗り出せると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト iPS 細胞由来心筋特異的な前駆細胞を用いた新しい心臓再生治療戦略を開拓することを目的とする。具体的には、1) 前駆細胞の詳細な性状解析、2) 前駆細胞の心臓移植法の開発、3) 前駆細胞移植が有効な対象疾患の探索、の 3 項目の解析を行い、心筋前駆細胞を臨床応用するための礎を築く。

3. 研究の方法

以下の 1) - 3) の 3 項目に関して検討し、新規心臓再生治療戦略を開発する。

- 1) CD82+心筋前駆細胞の性状解析
 - i) CD82+心筋前駆細胞の分化増殖特性の解析
 - ii) CD82+心筋前駆細胞の分化運命決定機構の解析
 - iii) CD82 の機能的意義の解析
- 2) CD82+心筋前駆細胞の心臓への移植法の開発
- 3) 種々の動物モデルを用いた有効性安全性の検討

4. 研究成果

- 1) CD82+心筋前駆細胞の性状解析

ヒト iPS 細胞から心筋細胞を分化誘導する過程において、細胞が心筋細胞となる運命決定がどのタイミングでなされるかを調べるため、心筋細胞への分化誘導過程の途中における心血管前駆細胞の代表的な細胞表面マーカーである KDR と PDGFR に着目し、iPS 細胞から分化誘導 3, 4, 5 日目の、両マーカーを発現している心血管前駆細胞をフローサイトメトリーにて精製し、それぞれを心筋特異的な分化誘導条件（無血清培地）または非心筋特異的な分化誘導条件（血清培地）にて 14 日間培養し心筋細胞への分化誘導を検討した。iPS 細胞から分化誘導 5 日目の段階で、非心筋特異的な分化誘導条件（血清培地）にて心筋細胞へ分化する、すなわち分化誘導 4 ~ 5 日目にかけて心筋への運命決定がなされることがわかった。

次に、ヒト iPS 細胞、分化誘導 3, 4, 5 日目の心血管前駆細胞と、分化した心筋細胞において、全遺伝子の発現を調べ、分化誘導 4-5 日目に特異的に発現する遺伝子を探索した。CD82 のみが分化誘導の日数（3 日、4 日、5 日）に従って発現が高くなり、かつ分化 4 日目から 5 日目にかけて有意に発現を高くしていることが分かった。

さらに、心筋細胞への分化誘導における CD82 の発現の経時変化を調べたところ、iPS 細胞から分化誘導 4 日目から CD82 陽性の細胞群が出現し始め、日数が経つにつれその割合は大きくなり 7 日後に最大 65% の細胞が CD82 陽性心血管前駆細胞となった。分化誘導 5 日目の時点で CD82 陽性細胞の割合が増加していることから CD82 は心筋に運命決定した前駆細胞 (CFPs; cardiomyocyte-fated progenitor cells) に特異的な細胞表面マーカーの候補分子であると考えられた。

i) CD82+心筋前駆細胞の分化増殖特性の解析
分化誘導 3, 4 日目の心血管前駆細胞から CD82 陰性（CD82 を発現していない）細胞群を、5 日目の心血管前駆細胞から CD82 陽性、陰性それぞれの細胞群を、そして 6, 7 日目の心血管前駆細胞から CD82 陽性細胞をそれぞれ精製し、非心筋特異的な分化誘導条件（血清培地）あるいは心筋特異的な分化誘導条件（無血清培地）で 14 日間培養し、心筋細胞への分化誘導を検討した。その結果、CD82 陰性心血管前駆細胞からは、心筋特異的な分化誘導条件（無血清培地）では 50 ~ 75% が心筋細胞に分化し心筋分化能を有していることが示されたものの、非心筋特異的な分化誘導条件（血清培地）ではほとんど心筋細胞に分化されず、他の種類の細胞である周皮細胞あるいは間葉系細胞となっていた。それに対し、CD82 陽性心血管前駆細胞からは、いずれの培養条件において、特に非心筋特異的な分化誘導条件（血清培地）においてもほとんどが心筋細胞へ分化しており、これらの結果より、CD82 が CFP のマーカー分子として妥当であると考えられた。

ii) CD82+心筋前駆細胞の分化運命決定機構の解析

CD82 は、細胞内の β -カテニンがエクソソームに含まれて排出されることで、Wnt シグナルの活性化を阻害することが知られている。また、Wnt シグナルの阻害により心血管前駆細胞から心筋細胞への分化が促進されることも知られていることから、心血管前駆細胞から心筋細胞への運命決定は、CD82 が β -カテニンを含むエクソソームの細胞外への排出に関与して、Wnt シグナルが阻害されることにより制御されていると考えられた。実際、分化誘導 5 日目の心血管前駆細胞において、CD82 を過剰発現させ、非心筋特異的な分化誘導条件（血清培地）で 2 日間培養したところ、培養上清の中のエクソソームが増加しており、さらには個々のエクソソーム内の β -カテニンの増加を認め、そのため細胞の核内の β -カテニンは減少し、結果、Wnt シグナルが抑制されることが明らかとなった。

iii) CD82 の機能的意義の解析

心筋前駆細胞段階で CD82 を過剰発現させ、心筋細胞分化が促進されるかを確認した。その結果、CD82 の過剰発現により心筋細胞への分化誘導効率が高くなった。これらの結果から、CD82 が心筋前駆細胞において、核内の β -カテニンがエクソソームにて排出されることにより、Wnt シグナルを抑制することで、心筋細胞への運命決定を促していることが明らかとなった。

2) CD82+心筋前駆細胞の心臓への移植法の開発

CD82 陽性心筋指向性前駆細胞を心筋梗塞モデルマウスの梗塞部位に針注入により移植し、1 ~ 3 ヶ月間観察した。その結果、移植細胞の約 95% が心筋細胞へと分化し梗塞部位に生着していた。さらに、移植 3 ヶ月後には移植された CD82 陽性 CFP 由来の心筋細胞の中にサルコメア構造が観察され、生着した心筋細胞が構造的に成熟していることが認められた。これらの結果から、ヒト iPS 細胞由来 CD82 陽性 CFP が、心臓梗塞部位に針注入による移植後生着し、高効率に心筋細胞に分化できることが示された。

これらの結果を論文化し、2018 年 1 月に Cell Reports 誌に発表した (Takeda, Cell Reports, 2018)。

3) 種々の動物モデルを用いた有効性安全性の検討

現在、ラット心筋梗塞モデルへの CD82 陽性 CFP の移植実験を行っており、移植後 1 ヶ月において心エコーによる心機能改善効果が認められる予備の結果を得ている。

このように本研究課題はほぼ計画通りに進捗し、論文報告を含む十分な成果を上げた。

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3件)

Matsuo T, Masumoto H, Tajima S, Ikuno T, Katayama S, Minakata K, Ikeda T, Yamamizu K, Tabata Y, Sakata R, Yamashita JK, Efficient long-term survival of cell grafts after myocardial infarction with thick viable cardiac tissue entirely from pluripotent stem cells, Scientific Reports, 査読有, 5: 16842, 2015
DOI: 10.1038/srep16842.

Jun K. Yamashita, Expanding reprogramming to cardiovascular progenitors, Cell Stem Cell, 査読無, 18: 299-301, 2016
DOI: 10.1016/j.stem.2016.02.010.

Takeda M, Kanki Y, Masumoto H, Funakoshi S, Hatani T, Fukushima H, Izumi-Taguchi A, Matsui Y, Shimamura T, Yoshida Y, Yamashita JK, Identification of Cardiomyocyte-Fated Progenitors from Human-Induced Pluripotent Stem Cells Marked with CD82, Cell Reports, 査読有, 22: 546-556, 2018
DOI: 10.1016/j.celrep.2017.12.057.

[学会発表](計20件)

武田匡史、山下潤、ヒト iPS 細胞由来新規心筋特異的前駆細胞表面マーカーの同定、第35回炎症・再生医学会・東京、2015/7/21-22

Takeda, M, Yamashita, JK, A newly identified cardiomyocyte-committed progenitor population for cardiac regeneration, International Society for Stem Cell Research・ストックホルム, 2015/6/24-27

Takeda M, Yamashita JK, A newly identified cardiomyocyte-committed progenitor population as a promising cell source for cardiac regeneration, 第79回日本循環器学会・大阪, 2015/4/24-26

武田匡史、山下潤、ヒト iPS 細胞由来 CD82 陽性心筋特異的前駆細胞の同定、第16回日本再生医療学会総会・仙台、2017/3/7-9

Masafumi Takeda, Jun K Yamashita, Identification of CD82-positive human cardiomyocyte-committed progenitors, 第81回日本循環器学会学術集会・金沢、2017/3/17-19

山下潤、ヒト iPS 細胞由来 3D 心臓組織による心臓再生の試み、第26回日本心血管インターベンション治療学会「特別企画」・京都、2017/7/7

山下潤、10年後の循環器領域における再生医療、第26回日本心血管インターベンション治療学会・京都、2017/7/7

山下潤、組織工学を用いた多層化心筋組織の作製と治療応用、第38回日本炎症・再生医学会/日本再生医療学会ジョイントシンポジウム・大阪、2017/7/17

山下潤、多能性幹細胞を用いた新しい3次元組織モデル、第38回日本炎症・再生医学会・大阪、2017/7/17

山下潤、臨床応用へ動き出した iPS 細胞による心臓再生治療 - 心臓細胞多層体の実用化 -、第87回県南循環器懇話会(特別講演)・岩手、2017/7/25

山下潤、Cardiovascular regeneration with human pluripotent stem cell-derived 3D cardiac tissue, Japan-Korea Joint Symposium of Vascular Biology・韓国、2017/8/24

山下潤、多能性幹細胞を用いた心血管系の分化再生研究 - 新たな細胞・モデル・治療戦略の探索 -、心血管代謝週間 CVMW2017・合同シンポジウム・大阪、2017/12/9

山下潤、Novel in Vitro Modeling of Lethal Arrhythmias with 3D Cardiac Structure Derived from Human iPS Cells, Myocardial Ischemia Symposium in Korea 2018、2018/2/22

武田匡史、山下潤、ヒト iPS 細胞由来 CD82 陽性心筋特異的前駆細胞の同定、第38回炎症・再生医療学会・大阪、2017/7/18-19

武田匡史、山下潤、Identification of CD82-positive human cardiomyocyte-fated progenitors, International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 2017 13th Annual Meeting・ボストン、2017/6/16

武田匡史、山下潤、ヒト iPS 細胞由来 CD82 陽性心筋特異的前駆細胞の同定、第17回再生医療学会、横浜、2018/3/21-23

武田匡史、山下潤、Identification of CD82-positive human cardiomyocyte-committed progenitors, 第82回日本循環器学会・大阪、2018/3/23-25

武田匡史、山下潤、Identification of CD82-positive human cardiomyocyte-fated progenitors in human pluripotent stem cell-derived cells, Anaheim・ロサン

ゼルス、2017/11/14

武田匡史、山下潤、Identification of hiPS-derived cardiomyocyte-committed progenitor (CCP) population、The 6th Retreat of CiRA・滋賀、2017/11/9-10

武田匡史、山下潤、Identification of CD82-positive human cardiomyocyte-fated progenitors in human pluripotent stemcell-derived cells、日本循環器学会基礎研究フォーラム・横浜、2018/3/23

〔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 1件)

名称：C D 8 2 陽性心筋前駆細胞
発明者：山下潤、武田匡史
権利者：iHeart Japan 株式会社
種類：通常
番号：JP 5924750
取得年月日：2016/4/13
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/yamashita_summary.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

山下潤(YAMASHITA, Jun)
京都大学・iPS細胞研究所・教授
研究者番号：50335288

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

武田匡史(TAKEDA, Masafumi)
京都大学・iPS細胞研究所・研究員