

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790746

研究課題名(和文)

多能性幹細胞の心室筋・心房筋分化メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis for mechanism of ventricular and atrial cardiomyocyte differentiation in pluripotent stem cells

研究代表者

田中 智文 (TANAKA TOMOFUMI)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：20468482

研究成果の概要(和文):

胚性幹(ES)細胞/誘導多能性幹(iPS)細胞は心筋分化誘導させると心房筋、心室筋、伝導系心筋など不均一な集団に分化することが知られている。我々はNogginによる一過的なBMPシグナル阻害とアスコルビン酸処理がマウスES細胞とヒトiPS細胞の心房筋分化を促進することを見出した。またG-CSFをヒトiPS細胞由来心筋細胞に添加することによりそれらの増殖を亢進することを見出した。

研究成果の概要(英文):

It has been appreciated that ES/iPS cells can differentiate into heterogeneous populations of atrial, ventricular, and specialized conduction cardiomyocytes in culture. We found that transient inhibition of BMP signaling by Noggin and ascorbic acid treatment induced atrial cardiomyocyte differentiation of mouse ES and human iPS cells. Furthermore, we found that G-CSF treatment enhanced proliferations of human iPS cell derived cardiomyocytes.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：多能性幹細胞、ES細胞、iPS細胞、分化誘導、心筋細胞、再生医学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 成体の心筋細胞は増殖能を失っているため、重篤な心筋炎や心筋梗塞により心筋細胞の大部分が壊死した場合、その根治的治療法としては心移植に頼らざるを得ないのが現状である。しかし近年、心臓の壊死領域に骨格筋細胞や胎児心筋細胞を移植することにより心機能の改善が認められることが報告されており、細胞移植による心筋再生治療の可能性が高まっている。この細胞源として胚性幹(ES)細胞あるいは誘導多能性幹(iPS)細胞が注目されている。

(2) ES/iPS細胞は、in vitro で三胚葉のそれぞれに由来する様々な細胞に分化誘導することができるが、それらの心筋細胞への分化効率は低く、実際には安定的かつ効率良く心筋細胞を得るためには技術的な困難を伴う。また他の血球系細胞や神経細胞等、その他の胚葉系の細胞も同時に分化してくるため、ES細胞を心筋細胞へ特異的に分化誘導することは困難である。

(3) 我々はこれまでに、NogginをマウスES細胞の未分化状態と分化誘導のごく初期に添加することにより、極めて効率よく心筋細胞に分化誘導できることを見出した(以

後、Noggin 法)。マウス ES 細胞においては、従来の分化誘導法では胚様体(Embryoid body、以下 EB)中の 1 割程度の細胞しか心筋細胞へは分化しないが、我々の方法では、9 割以上の細胞を心筋細胞に分化させることが可能である。こうして EB 中のほとんどの細胞を心筋細胞に分化誘導する方法は確立できるものの、分化した心筋細胞には心室筋および心房筋が混在している状態であり、心室筋、あるいは心房筋特異的に分化誘導する技術は確立できていない。

## 2. 研究の目的

心筋には細胞表面などの選択可能なマーカーが知られていないため、分化したヘテロな細胞集団から心筋細胞を選別してくる必要がある。これまでに遺伝子改変技術を用いて、心室筋細胞特異的に分化誘導する方法などが複数のグループから報告されているが、将来、ヒトへの臨床応用を考えると、遺伝子改変技術そのものの問題や、その精製率などの問題から、遺伝子改変を行わない方法を開発しなければならない。また将来の移植コストをできる限り抑えるためには、できる限り分化効率を高め、目的の細胞のみを特異的に作製する方法が望まれる。

これまでに薬剤を添加することにより心室筋や心房筋に分化誘導する方法が報告されている。マウス ES 細胞に A2P (L-ascorbic-2-phosphate; 以下アスコルビン酸)と、AzC (L-2-Azetidine carboxylic acid)を添加すると、濃度依存的に心房筋特異的に分化誘導できる報告(Sato H. et al BBRC 2006)(以後 AA 法)と、マウス ES 細胞にレチノイン酸を添加することにより、時間および濃度依存的に心室筋に分化誘導できるという報告(Wobus A.M. et al J Mol Cell Cardiol. 1997)(以後 RA 法)は、各細胞への分化効率は低い、心筋細胞前駆体が心室筋・心房筋への成熟するために RA および AA により分化制御遺伝子が発現変動し、各細胞系譜への分化を制御していることは間違いないと考えた。そこで、これまでに確立した Noggin 法と AA 法、Noggin 法と RA 法を組み合わせ、マウス ES 細胞の心房筋および心室筋分化が亢進させられるかを確認した。またヒト iPS 細胞においてもこれらの効果を確認し、さらに DNA アレイ解析により心筋分化のメカニズムを解析し、ヒト iPS 細胞による再生医療における基礎技術開発を本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

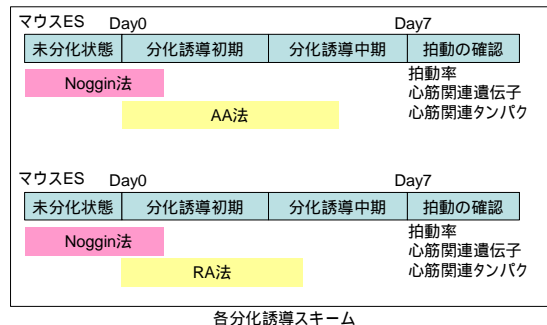
(1) マウス ES 細胞における効率的な心筋、心室筋分化法の探索として、高率な心筋

分化誘導法である Noggin 法と、AA 法を組み合わせた効率的な心房筋への分化が可能か、または Noggin 法と RA 法を組み合わせた効率的な心室筋への分化が可能かを以下の方法で確認した。

Noggin と AA の至適添加濃度と添加時期の探索。

Noggin と RA の至適添加濃度と添加時期の探索。

、の至適条件における EB の拍動率、および心筋関連遺伝子・タンパクの発現確認による各心筋への分化の評価。



(2) ヒト iPS 細胞での効率的な心筋分化誘導法の報告は少なく、Noggin を用いた心筋分化誘導法がヒト iPS 細胞では未確認であったため、その効果の以下の方法で確認した。さらに AA 法の効果も確認した。

Noggin 添加の至適時期、濃度の検討。

AA 添加の至適時期、濃度の検討。

、の至適添加条件において未添加群との心筋分化の比較(EB の拍動率、心筋関連遺伝子・タンパクの発現)

(3) マウス ES 細胞の Noggin を用いた心筋分化誘導における DNA アレイ解析。見出された候補遺伝子の心筋分化における影響を以下の方法で確認した。

Noggin 添加/未添加で分化誘導して、経時的にサンプルを回収、DNA アレイに供し、その結果 2 倍以上発現変動があった遺伝子を抽出。

のうち特に心筋分化に関与していると期待される遺伝子のうちリコンビナントタンパクが市販されているものを選択して、Noggin 未添加で分化誘導後、そのリコンビナントタンパクをヒト iPS 細胞に添加した時の心筋分化における影響を確認。また Noggin とそのリコンビナントタンパクの組み合わせ効果を確認。

## 4. 研究成果

(1) マウス ES 細胞において Noggin 法とアスコルビン酸(AA)法を組み合わせることに

より、従来法よりも効率よく心房筋細胞へ分化誘導することに成功。

まずはじめに、論文報告されている AA 法の単独効果を確認したところ、論文報告とほぼ同等の心房筋への分化効果を確認した。アスコルビン酸と AzC の添加よりもアスコルビン酸単独の方がより強い効果が認められた。RA 法の単独効果も確認したが、遺伝子発現ではやや心室筋への分化促進の傾向も認められることもあったが、複数回の再現性確認実験において論文で報告されているような顕著な心室筋分化効果は確認することができなかった。

次に Noggin 法と AA 法および RA 法の組み合わせ効果を確認した。マウス ES 細胞を用いた Noggin 法において、至適条件はすでに決定しているため、その条件に決定した AA 法と RA 法の至適条件を組み合わせた。その結果、Noggin+AA 法の組み合わせでは AA 法単独よりも 1.5~2 倍程度心房筋分化促進効果が認められた。一方、Noggin+RA 法の組み合わせでは Noggin 法による心筋分化促進効果は認められるが、RA 法単独と比較しても EB 中の心室筋の含量にほとんど差は認められなかった。

以上の結果からマウス ES 細胞の心房筋への効率的な分化誘導法として Noggin 法と AA 法の組み合わせは有効であることが明らかとなった。

(2) ヒト iPS 細胞において Noggin 法および AA 法が有効であることを確認。

ヒト iPS 細胞はマウス ES 細胞と異なり、単一細胞に分散するとアノキスと呼ばれる細胞死を起し死滅してしまうという大きな特徴を有しており、マウス ES 細胞と同条件、すなわち酵素処理で単一細胞に分散して細胞数をカウントし、1EB の大きさを揃えて分化誘導するのは困難である。ROCK 阻害剤の添加によりヒト iPS 細胞を単一細胞に分散しても死滅させずに EB 形成させる方法も論文報告されている(Watanabe K. et al Nature Biotechnology 25(6):681-6(2007)) が、報告者はヒト iPS 細胞の分化誘導においてコロニーを単一細胞に分散するのではなく、40 $\mu$ m と 70 $\mu$ m のフィルターを用いて分画、均一な EB を作製する方法を考案した。

ヒト iPS 細胞を酵素的にフィーダー細胞から剥離し、10 回程度緩やかなピペティングで小塊へと分散する。これを市販されている 70 $\mu$ m のナイロンメッシュフィルターを通過させ、次に 40 $\mu$ m フィルターを不通過な画分を得る。この 40~70 $\mu$ m 画分のヒト iPS コロニーが分化誘導に適していることを見出した。

この方法を見出すまで再現性良くヒト iPS 細胞を心筋細胞へ分化誘導することがで

きなかったが、本方法を考案したことにより、再現性よく以下(2)(3)(4)に示すヒト iPS を用いた実験を行うことができるようになった。

Noggin 処理と を組み合わせ EB 形成したところ、ヒト iPS 細胞においても 10~15% 程度の効率で拍動性 EB が出現することを確認した。また Real-time RT-PCR により心筋関連遺伝子発現、免疫染色により心筋関連タンパクの発現が未処理群よりも亢進していることを確認した。

AA 処理と を組み合わせ EB 形成したところ、ヒト iPS 細胞においても 5% 程度の効率で拍動性 EB が出現することを確認した。また Real-time RT-PCR により心筋関連遺伝子発現が未処理群よりも亢進していることを確認した。

ヒト iPS 細胞における Noggin 法と AA 法の組み合わせ効果においては有効性を示す結果が得られつつあるが、現在詳細な効果を確認中である。

(3) G-CSF がヒト iPS 細胞由来心筋細胞の増殖を促進することを確認。

ヒト iPS 細胞の分化誘導において Noggin 法および AA 法が有効であることを確認できたため、マウス ES 細胞で有効性が確認された分化誘導法はヒト iPS でもその効果が期待できる。またヒト iPS 細胞はマウス ES 細胞と比べ増殖が遅く、(2) - に記載した通り分化誘導もマウス ES 細胞に比べ難しかったため、マウス ES 細胞を用いて心筋分化のメカニズム解析を行い、その結果をヒト iPS 細胞に応用することにした。

マウス ES 細胞を Noggin 処理、もしくは未処理で分化誘導し、経時的にサンプルを回収、DNA アレイ解析を行い、2 倍以上発現変動する遺伝子をピックアップした。その中で注目した G-CSF はリコンビナントタンパクが市販されており、添加実験に適していると判断した。

次にヒト iPS 細胞の分化誘導系において、Noggin 処理を行わず、上記(2) - の方法を用いて EB 形成し、分化誘導の中期に G-CSF を添加したところ、拍動性 EB の出現率は 5% と未添加群よりも亢進し、さらに EB 中の心筋含量が増加していることも見出した。心筋細胞の増殖を判定する方法として BrdU の取り込み効率を確認した結果、G-CSF はヒト iPS 細胞由来心筋細胞の増殖を促進していることを見出した。

(4) ヒト iPS 細胞において Noggin と G-CSF の組み合わせが心筋細胞への分化と増殖を促進することを確認。

(2) - と(3) - の成果を組み合わせ

せて、ヒト iPS 細胞における Noggin 法と G-CSF 添加の組み合わせ効果を確認した。ヒト iPS 細胞は因子未添加の状態での拍動率は 1%程度であったが、Noggin 法と G-CSF 法の組み合わせにより拍動率が 20%程度まで亢進した。また EB 中の心筋細胞含量も増加していることを免疫染色により確認した。

マウス ES 細胞において有効性を確認した Noggin 法、AA 法がヒト iPS 細胞においても有効であることを明らかにしたこと、またマウス ES 細胞の心筋分化メカニズム解析を元に見出された G-CSF が、実際にヒト iPS 細胞でも有効であるということを確認したことは世界初であり、非常に重要な知見である。その理由は、マウス ES 細胞は LIF で、ヒト iPS (もしくはヒト ES) 細胞は bFGF で未分化状態が維持されていることが知られており、マウスとヒトの未分化状態の維持に関してのシグナル系は異なるが、心筋分化誘導に関してはマウスもヒトもほぼ同じメカニズムであることを 3 つの方法で証明したからである。

最近、様々な添加因子を用いてヒト iPS 細胞の効率よく分化誘導したという報告はあるが、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を増殖させたという報告は少なく、今回報告者が見出した Noggin 法、AA 法による分化促進と G-CSF による心筋増殖法の組み合わせは、ヒト iPS/ES 細胞を用いた心筋再生治療の実現に向けた基礎研究として非常に有用であると言える。

今後ヒト iPS/ES 細胞を用いた心筋分化メカニズム解析やそれを応用した移植医療法の開発など多くの研究が進展す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)

田中 智文、小清水 右一、福田 恵一

「BMP アンタゴニスト処理によるヒト ES/iPS 細胞の効率的な心筋分化誘導法の確立」第 9 回日本再生医療学会、2010 年 3 月 19 日、広島国際会議場(広島)

〔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〕

なし

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

田中 智文(TANAKA TOMOFUMI)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：20468482

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし