

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K15981

研究課題名（和文）IGF-2陽性iPS細胞由来心筋前駆細胞の樹立と機能解析及び心筋移植効果の検討

研究課題名（英文）Establishment and functional analysis of IGF-2 positive iPSC-derived cardiac progenitor cells as a novel tool for cardiac cell transplantation

研究代表者

青沼 達也（Aonuma, Tatsuya）

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：90646001

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、心筋分化効率が高いiPS細胞由来心筋前駆細胞（iPSC-CPC）を純化、精製してマウス心筋梗塞モデルに移植して治療効果を検討する事である。研究者らの予備検討で心筋分化効率が高い心筋前駆細胞由来iPSCに高発現していたIGF-2に着目し、心筋分化誘導を行ったiPSCからIGF-2陽性細胞を精製した。研究者らは精製したiPSC由来IGF-2陽性細胞は非常に高い心筋分化効率を有する心筋前駆細胞であることが確認し、また精製したIGF-2陽性細胞の拡大培養方法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞由来心筋細胞の移植治療において、純化成熟心筋細胞への分化誘導、分化抵抗性iPS細胞排除の実現には未だハードルがある。本研究では心筋分化誘導を行ったiPS細胞から心筋分化効率が非常に高いIGF-2陽性心筋前駆細胞を移植細胞として純化・精製することに成功した。iPS細胞由来の心筋前駆細胞の精製・移植による心筋再生を実現する技術は未だに報告がない独創的な試みであり、本研究成果をさらに発展させる事で前駆細胞の特性を生かした幅広い心疾患患者に対する臨床応用への発展が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this research is to establish iPSC-derived cardiac progenitor cells which have superior capability of cardiac differentiation and to assess therapeutic effect of the iPSC-derived cells by transplanting into mouse myocardial infarction models. Based on our preliminary data that cardiac progenitor cells-derived iPSC which have high superior capability of cardiac differentiation had higher expression levels of IGF-2, we purified IGF-2 positive cells from cardiac differentiated iPSCs. We demonstrated that purified iPSC-derived IGF-2 positive cells have superior capability of cardiac differentiation. We established the method for expanding cell culture of the IGF-2 positive cardiac progenitor cells.

研究分野：再生医療， iPS細胞， noncoding RNA

キーワード：再生医療 iPS細胞 心筋前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 2008年にiPS細胞から心筋細胞が樹立されて以降、iPS細胞由来心筋細胞の移植治療は動物モデルにおける有用性の報告を背景とした様々な方法論が展開されているが¹⁾、未だ心疾患患者に対する臨床応用は実現していない。律速となっているのはiPS細胞の心筋分化効率の不安定性であり、全ての細胞を完全に心筋細胞へと分化させるプロトコルは未だ確立していない。さらに移植治療では奇形腫の原因となる分化抵抗性iPS細胞を排除する必要があるが、これも種々の方法論があるものの未だ開発途上である²⁾。この課題を克服するためには分化心筋細胞の作成という方法論に変わる新たな手法を開発する必要があり、心筋前駆細胞移植はその有力な候補と考えられるが³⁾、その手法を実現する為の心筋前駆細胞マーカーは未だ発見に至っていない。申請者らは、これまでにマウス心臓よりSca-1陽性心筋前駆細胞を樹立しその心筋再生及び心機能改善効果を明らかにしてきた⁴⁾。しかし、心臓を供給源とする心筋前駆細胞は体性幹細胞故に分化指向性の限界があること、そもそも組織採取が困難であることからその臨床応用は極めて限定される。この2点を解決するために単クローンから分化指向性を高める方法論としてiPS細胞を原料とする心筋前駆細胞の樹立が期待されるがその特異的マーカーは未だ不明である。

(2) 申請者らはそのマーカー探索のため心臓由来のiPS細胞(CiPSC)を樹立しその特性解析を行ってきた。結果、CiPSCはマウス皮膚線維芽細胞由来のiPS細胞(TiPSC)に比しiPS細胞としての特性は同等であるにもかかわらず、胚葉体(EB)形成による*in vitro*心筋分化誘導において極めて高い心筋分化能を発揮することを確認した。そこでCiPSCの有する特異的な心筋分化因子を同定するため、TiPSCをコントロールとした網羅的遺伝子解析を行ったところ、CiPSCにおいて特異的に発現が高い遺伝子としてIGF-2が同定された。定量性解析においてもIGF-2の発現レベルはES細胞やマウス胎児繊維芽細胞(MEF)由来iPS細胞に比べても明らかにCiPSCで上昇していることが確認されている。IGF-2は一部IGF-1と共通のレセプターを介して細胞増殖や血管新生を促進する因子として知られており、特に発生の初期において幹細胞増殖に非常に重要な役割を果たしている。これまでに神経疾患や癌領域におけるIGF-2に関する種々の報告があるが、心筋分化に関する報告はされていない。

2. 研究の目的

本研究の仮説はiPS細胞の心筋分化誘導によって得られたIGF-2陽性細胞は心筋分化効率が高い心筋前駆細胞であり、虚血心に対して高い治療効果を有する事である。仮説を検証するため、(1)心筋分化誘導したiPS細胞からIGF-2陽性細胞を精製(ソーティング)することで、分化抵抗性iPS細胞を除去して心筋分化効率が高い心筋前駆細胞(CPC)を純化し、(2)純化・精製されたIGF-2陽性iPS細胞由来CPCを心筋梗塞後のマウス心筋に移植し、マウス梗塞心における治療効果、及び安全性を検討する事を目的とする。

3. 研究の方法

MEF由来iPS細胞に心筋分化誘導を行いIGF-2陽性細胞の変化をFACSにて解析した結果、分化誘導5日目でIGF-2陽性細胞の増加が確認された。これにより、IGF-2が初期の心筋分化過程において極めて重要な役割を果たしていることが示唆され、IGF-2を指標としたセルソーティングによる純化精製の手法が可能であることが示された。

本研究ではこの手法を応用して心筋分化誘導を行ったiPS細胞集団からCPCとしての適切な誘導期にIGF-2陽性細胞をFACS Ariaを用いて効率よく精製するため、iPS細胞の心筋分化効率を向上させるためのサイトカイン濃度、並びにソーティングの際のIGF-2抗体の反応条件の最適化を行なった。得られた細胞集団の心筋前駆細胞としての特性を検討するため、心筋分化誘導後の拍動心筋発現率を検討し、CPCのマーカーであるTbx5、Mef2Cの発現量を定量した。さらにIGF-2陽性iPS細胞由来CPCをヌードマウス梗塞心に移植するための準備段階として、精製した細胞を効率よく増殖させるための培養系を検討した。

4. 研究成果

(1) iPS細胞の心筋分化効率の向上

本研究の目的であるIGF-2陽性CPCの樹立に向けて、(1)心筋分化効率の向上、及びFACSを用いたIGF-2陽性細胞のソーティングの条件の最適化、(2)IGF-2ソーティング後のCPC培養系確立の2点を行った。(1)についてはiPS細胞胚葉体の拍動心筋発現率が研究開始時には2%であったが、心筋分化における至適サイトカイン濃度を検討し、特に)Wnt阻害剤の添加濃度等を大幅に変更することで、50~60%へと著しい改善を実現することができた。IGF-2陽性細胞のソーティングに関しては、ソーティングに用いる抗体の濃度、反応時間を調整する事で、研究開始時にはIGF-2陽性細胞の分取率が10%前後から、安定して30%前後が実現できるように

なった(図1)。

(2) IGF-2 陽性心筋細胞の培養系確立

IGF-2 陽性心筋細胞をソーティングした後の拡大培養方法についてサイトカインの調整、培養ディッシュの選定、接着培養系(コラーゲンコート、ゼラチンコート) sphere 培養系(浮游系)について検討を行った。ソーティング後の IGF-2 陽性細胞は直接接着系培養を行っても細胞皿に付着増殖させることが困難であったため、まず 96well 浮游培養で sphere 形成を行った。結果、7 日間で形成された sphere をコラーゲンの接着培養に供すると sphere が接着することで細胞が付着培養系に移行し、増殖することが確認された。一方、IGF-2 陽性細胞はこの sphere のまま培養継続することで、FGF-2 刺激下で高率に拍動塊が出現し、iPS 細胞の分化効率 6% に比し、97.9% の分化効率が観察された(図 2A)。これらの細胞では Tbx5、Mef2C の発現が iPS 心筋分化細胞に比し 10 数倍に亢進しており、IGF-2 陽性細胞が心筋前駆細胞であることが確認された(図 2B)。

IGF-2 陽性細胞の拡大培養をさらに効率化させるためリアクター型浮游回転培養系で検討を行った。リアクターによる浮游回転培養では、single cell 及び再凝集させた sphere 細胞塊を用いて増幅培養を試みたが、いずれの条件においても維持培養はできるものの細胞数の増幅には至らず、IGF-2 陽性細胞はリアクター浮游培養系で増殖培養は困難であることが判明した。

本研究では心筋分化誘導を行った iPS 細胞から心筋分化効率が非常に高い IGF-2 陽性心筋前駆細胞を移植細胞として純化・精製することに成功した。iPS 細胞由来の心筋前駆細胞の精製・移植による心筋再生を実現する技術は未だに報告がない独創的な試みであり、本研究成果をさらに発展させる事で前駆細胞の特性を生かした幅広い心疾患患者に対する臨床応用への発展が期待できる。

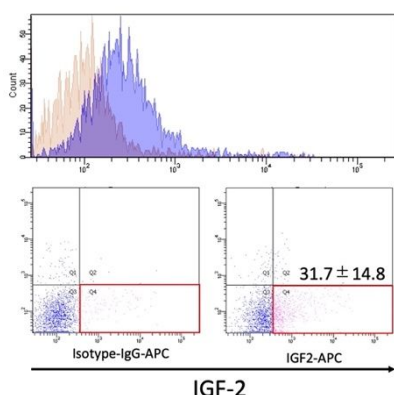


図1. 心筋分化誘導後のiPS細胞におけるIGF-2陽性細胞の発現率

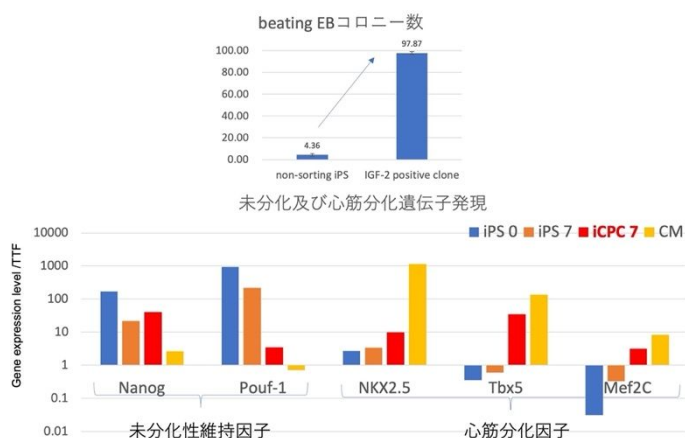


図2A. IGF-2陽性細胞の心筋分化誘導効率

図2B. IGF-2陽性細胞(iCPC7)の未分化性維持因子、心筋分化因子発現量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------