

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目： 基盤研究 (B)
 研究期間： 2007~2008
 課題番号： 19390213
 研究課題名 (和文) ヒト ES 細胞を用いた包括的心臓再生治療戦略の開拓
 研究課題名 (英文) Development of comprehensive cardiac regeneration strategies with human ES cells
 研究代表者
 山下 潤 (YAMASHITA JUN)
 京都大学・再生医科学研究所・准教授
 研究者番号： 50335288

研究成果の概要：

代表者はマウス ES 細胞を用いて循環器系細胞を系統的に誘導できる新しい分化誘導系を開発した。本研究は、同システムを用いて、新たな心臓再生治療応用シーズを探索し、細胞・遺伝子・薬剤など新たな治療法を包括的に開拓することを目的とした。心筋細胞の自動能維持機構の解析、心筋及び心筋前駆細胞分化誘導効率を約 10 倍高める物質の同定、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) からの心血管分化誘導法の開発を行い、種々の心臓再生戦略のシーズ開発に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2008 年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

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： ES 細胞、心臓再生、心筋分化、ペースメーカー、前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、マウス及びヒト ES 細胞 (胚性幹細胞) を用いて血管および心臓の分化再生研究を行い、ES 細胞から誘導した Flk1 (2 型 VEGF 受容体) 陽性細胞を共通の前駆細胞として、主要な循環器系構成細胞をすべて系統的に分化誘導することに成功してきた (Yamashita, *Nature*, 2000; *FASEB J*, 2005 ほか)。同分化系により心筋分化過程とその

機構を細胞レベルで解析できるとともに、心筋再生に寄与しうる様々な種類・分化段階の細胞を系統的に誘導・純化することが可能となり、それにより、細胞移植による心筋ポンプ機能改善のみならず、心臓ペースメーカーの再生や心筋前駆細胞をターゲットとした新しい遺伝子治療や創薬など、新たな治療法の開拓を試みることができるようになった。

2. 研究の目的

本研究は、代表者等のES細胞分化システムを用いて、新たな心臓再生治療応用シーズの探索を行うとともに、細胞・遺伝子・薬剤など新たな治療応用の可能性を包括的に開拓することを目的とし、**1)** PM細胞の誘導・純化・移植法、**2)** 心筋前駆細胞を用いた効率的な心筋再生法、**3)** 心筋及び前駆細胞分化誘導因子による新たな心臓再生治療法の開発、及び**4)** 新規心臓再生治療標的分子の探索を行った。

3. 研究の方法

- (1) ES 細胞由来心筋細胞の自動能維持機構の解析
 - ① ES 細胞由来心筋の長期培養における拍動・非拍動心筋の出現と種々のイオンチャンネル発現量の比較
 - ② 拍動心筋及び非拍動心筋におけるパッチクランプ法によるイオンチャンネル機能の評価
- (2) 心筋及び心筋前駆細胞の効率的な分化誘導
 - ① Flk1 陽性細胞からの心筋分化を促進する物質の探索
 - ② Flk1 陽性細胞からの心筋前駆細胞の分化促進物質の探索
 - ③ 心筋前駆細胞の生体内における分化能の検討
- (3) iPS 細胞からの心血管分化系の構築

4. 研究成果

- (1) ES 細胞由来心筋細胞の自動能維持機構の解析
 - ① マウス ES 細胞由来心筋細胞を長期培養(分化後 23 日)すると拍動心筋細胞コロニーが減少し、HCN1, 4, Cav3.1, 3.2 の各イオンチャンネルの発現が減少したが Kir2.1 発現は変化しなかった。
 - ② 非拍動心筋では、HCN チャンネルによる I_h 電流が消失し Cav3 による T 型 Ca 電流が有意に減少していた。
HCN 及び Cav3 チャンネルが心筋自動能維持とペースメーカー機能に必要なことを示し、ペースメーカー細胞誘導における基礎的条件を明らかにした (Yanagi, **Stem Cells**, 2007)。
- (2) 心筋及び心筋前駆細胞の効率的な分化誘導
 - ①②免疫抑制剤サイクロスポリン A が強力な心筋系列細胞の誘導作用を有し、Flk1 陽性細胞からの心筋及び心筋前駆細胞の分化を約 10-20 倍促進させることを見いだした。
 - ③ ラット心筋梗塞モデルに移植された心筋

前駆細胞は効率的に生着し、再生心筋として寄与した。

新しい心筋系列細胞の効率的誘導法・誘導物質を同定するとともに、心筋前駆細胞治療という新しい心筋再生の可能性を開拓した (Yan, **Biochem Biophys Res Commun**, 2009; 日本循環器学会留学生 YIA)。

(3) iPS 細胞からの心血管分化系の構築
マウス ES 細胞分化研究におけるノウハウをマウス iPS 細胞に導入することにより、マウス iPS 細胞から、心筋細胞及び動脈リンパ管内皮、血球、血管壁細胞など循環器系細胞を系統的に分化誘導することに成功した。世界最初の iPS 細胞からの系統的な心血管分化誘導系 (Narazaki, **Circulation**, 2008; Circulation, Best Paper Award in Basic Science 2008.)

このように心筋分化再生における種々の新しい知見を明らかにし、様々な心臓再生戦略のシーズ開発に成功した。

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 6 件)

1. Yan P, Nagasawa A, Uosaki H, Sugimoto A, Yamamizu K, Teranishi M, Matsuda H, Matsuoka S, Ikeda T, Komeda M, Sakata R, Yamashita JK*. Cyclosporin-A potently induces highly cardiogenic progenitors from embryonic stem cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 379: 115-120, 2009
2. Narazaki G, Uosaki M, Teranishi M, Okita K, Kim B, Matsuoka S, Yamanaka S, Yamashita JK*. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. **Circulation**, 118: 498-506, 2008
<Circulation 2008, **Best Paper Award in Basic Science**>
3. Nakao Y*, Narazaki G, Hoshino T, Maeda S, Yoshida M, Maejima H, Yamashita JK*. Evaluation of antiangiogenic activity of azumamides by the in vitro vascular organization model using mouse induced pluripotent stem (iPS) cells. **Bioorg Med Chem Lett**, 18: 2982-2984, 2008
4. Yanagi K, Takano M, Narazaki G, Uosaki H, Hoshino T, Ishii T, Misaki T, Yamashita JK*. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels and T-type calcium channels confer automaticity of

- embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. **Stem Cells**, 25: 2712-2719, 2007.
5. Sone M, Itoh h, Yamahara K, Yamashita JK, Yurugi-Kobayashi T, Nonoguchi A, Suzuki Y, Chao TH, Sawada N, Fukunaga Y, Miyashita K, Park K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Tamura N, Kondo Y, Nito S, Suemori H, Nakatsuji N, Nishikawa SI, Nakao K. Pathway for differentiation of human embryonic stem cells to vascular cell components and their potential for vascular regeneration. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 27: 2127-2134, 2007.
 6. Yamashita JK. Differentiation of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells from vascular progenitors. **Trends Cardiovasc Med**, 17: 59-63, 2007.

[学会発表] (計 21 件)

1. Narazaki G, Yamashita JK. Systematic differentiation system of mouse induce pluripotent stem (iPS) cells to cardiovascular cells (invited). The 6th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology And The 16th Annual Meeting of the Japan Vascular Biology and Medicine Organization Joint Meeting, 2008. 12. 3-5. Kanazawa
2. 山水 康平、山下 潤. Notchと beta-catenin シグナルによる新しい動脈内皮細胞分化誘導機構. 第15回心血管内分泌代謝学会YIA審査講演. 2008. 11. 28-29. 熊本
3. Yamamizu K, Yamashita JK. Converged signaling of Notch and beta-catenin induces differentiation of arterial endothelial cells from VEGFR2+ vascular progenitors. American Heart Association Scientific Session 2008 (Oral presentation). 2008. 11. 8-14. New Orleans, USA
4. Narazaki G, Teranishi M, Uosaki H, Okita K, Kim BJ, Matsuoka S, Yamanaka S, Yamashita JK. Cardiovascular Cell Differentiation System Using Mouse Induced Pluripotent Stem Cells. 6th ISSCR Annual Meeting, 2008 (Oral presentation). 6. 11-14. Philadelphia, USA
5. Yamamizu K, Yamashita JK. Phosphatidylinositol 3-kinase pathway and Notch signaling coordinately induce differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors. The 15th International Vascular Biology Meeting (Oral presentation). 2008. 6. 1-5. Sydney, Australia
6. Yan P, Otsuji T, Nagasawa A, Narazaki G, Uosaki H, Sugimoto A, Fujiwara M, Ikeda T, Nakao K, Yamanaka S, Nakatsuji N, Komeda M, Yamashita JK. Efficient and Specific Expansion of Highly Cardiogenic Progenitors from Embryonic Stem Cells by Cyclosporin-A treatment. 第72回日本循環器学会留学生YIA審査講演. 2008. 3. 28-30. 福岡
7. 山下 潤. ES細胞及びiPS細胞を用いた心血管分化再生研究. 熊本Science Frontier研究会 (特別講演). 2008. 12. 10. 熊本
8. 山下 潤. ES細胞及びiPS細胞からの心血管分化. BMB2008 シンポジウム: IS1 多能性幹細胞を規定する因子群 -臨床応用を見据えて- (招請講演). 2008. 12. 9. 神戸
9. Yamashita JK. Molecular mechanisms of arterial-venous specification. 第16回日本血管生物医学会・日韓合同血管生物シンポジウム(invited). 2008. 12. 3-5. 金沢
10. Yamashita JK. Research for vascular development and regeneration using ES and iPS cells. The 24th Kumamoto Medical Bioscience Symposium "Frontiers of Vascular Medical Science and Innovative Therapy" (invited). 2008. 11. 27. Kumamoto
11. Yamashita JK. Specific Expansion of Cardiac Progenitors and Cardiomyocytes from ES and iPS Cells. The Second International Cell Therapy Conference (invited). 2008. 11. 20. Seoul, Korea
12. 山下 潤. 幹細胞と再生医学 -心臓や血管は再生できるか-. 京都南ロータリークラブ講演会 (招請講演). 2008. 10. 16. 京都
13. 山下 潤. ES細胞及びiPS細胞を用いた心血管分化再生研究. 佐賀・生活習慣病フォーラム 2008. (特別講演) 2008. 8. 2. 佐賀
14. 山下 潤. ES細胞およびiPS細胞を用いた心血管分化再生研究. 第1回臨床研究フォーラム (招請講演). 2008. 8. 8-9. 御殿場
15. 山下 潤. ES細胞及びiPS細胞を用いた心血管分化再生研究. 心血管再生先端治療フォーラム (特別講演). 2008. 7. 5. 東京

16. Yamashita JK. Effective cardiac regeneration in vivo by ES cell-derived cardiac progenitors. Japan-Korea Cardiovascular Conference, 第7回日本循環器学会(招請講演). 2008. 3. 28-30. 福岡
17. Yamashita JK. Cellular and molecular mechanisms for diversification of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells. THE U.S.-JAPAN COOPERATIVE CANCER RESEARCH PROGRAM WORKSHOP 2008 (invited), 2008. 3. 19-21. Kyoto
18. 山下 潤. ES細胞及びiPS細胞を用いた心血管分化再生研究. 山口免疫懇話会(特別講演). 2008. 3. 5. 山口
19. 山下 潤. ES細胞を用いた新しい構成的アプローチによる血管分化多様化機構の解析と再構成. 第30回日本分子生物学会ワークショップ「血管リンパ管研究の新展開」(オーガナイザー) 2007. 12. 14. 横浜
20. 山下 潤. ES細胞を用いた構成的アプローチによる血管分化多様化機構の解析. 日本血栓止血学会シンポジウム(招請講演) 2007. 11. 16 三重
21. Yamashita JK. Prospective identification of cardiac progenitors. 4th Annual Symposium of the American Heart Association Council on Basic Cardiovascular Sciences -Cardiovascular Repair and Regeneration. (Invited) 2007. 7. 30. Keystone, USA

[図書] (計 2 件)

1. 山下 潤. 「ES細胞、iPS細胞を用いた血管再生医療技術」幹細胞の分化誘導と応用 - ES細胞・iPS細胞・体性幹細胞研究最前線-. 第3章p253-261, 2009. NTS.
2. Yamashita JK. A linkage in the developmental pathway of vascular and hematopoietic cells. In Tanaka K, Davie EW. **Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis 2008**. Part 5, p363-p373. Springer, Tokyo, 2008

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: Efficient production and use of highly cardiogenic progenitors and cardiomyocytes from embryonic and induced pluripotent stem cells

出願番号: PCT/JP2008/066033

発明者: 山下潤、顔培実

権利者: 京都大学

出願日: 2008年8月29日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 潤 (YAMASHITA JUN)

京都大学・再生医科学研究所・准教授

研究者番号: 50335288

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし