

機関番号：13201
研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2008～2010
課題番号：20390366
研究課題名（和文） ヒト羊膜細胞によるペースメーカー細胞の樹立と新たなペーシング療法の開発
研究課題名（英文） The establishment of Pacemaker cell line from human amnion delivered cells, and development of the new pacing therapy
研究代表者
三崎 拓郎（MISAKI TAKUROU）
富山大学・名誉教授
研究者番号：40092811

研究成果の概要（和文）：

現行のペースメーカー治療に替わる、新たな治療法として、羊膜細胞を用いたペースメーカー細胞治療を行うべく、ヒト羊膜細胞を高率に心筋へ分化誘導させる方法として、ヒト羊膜細胞から Nanog 陽性細胞を純化する方法、およびヒト羊膜細胞に Oct4 遺伝子を導入しより未分化な状態へと励起させる方法を開発した。いずれの方法においてもより高率よく、さらにより高度に心筋様に分化した細胞への変化が認められ、これらの細胞は、自動能にかかわるイオンチャネルや活動電位を伝搬させる Gap junction を形成する Connexin などペースメーカー機能を有するにあたり必須と思われる構造を有しており、ヒト羊膜細胞によるペースメーカー細胞樹立の可能性が高まった。

研究成果の概要（英文）：

In order to perform pacemaker cell replacement therapy using amnion delivered cells as a new therapy instead of the mechanical pacemaker implantation, we developed some methods that to purify Nanog positive cells from Human amnion delivered cells, and gene transfection of Oct4 into Human amnion delivered cells to activate into undifferentiated state. In both methods, more high rate and highly differentiated cardiomyocyte-like cells were observed. These cells showed some structures that are essential to perform as a pacemaker, ion channels that associate with automaticity, and Connexin which forms Gap junction making action potential propagate. We have showed the possibility of the pacemaker cells establishment using Human amniotic delivered cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
総計	6,200,000	1,860,000	8,060,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学

キーワード：心臓大血管外科学

1. 研究開始当初の背景

除脈性不整脈に対しての手術療法は依然としてペースメーカー植え込みにとどまっているが、この方法には本体およびリードの耐久性、患者の心的・経済的負担、国家の医療経済的負担などの問題がある。

細胞由来のペースメーカー治療はこれらの問題を打破すべく新しい治療法として期待される。

すでに、ES (胚性幹細胞) 細胞からは自律拍動する心筋細胞への分化、またその中からペースメーカー細胞を純化する方法が確立されておりペースメーカー細胞治療を行う上での細胞供給源としては ES 細胞が最も有力と思われるが、その一方で ES 細胞を用いての研究では受精卵の破壊を必要とし、拒絶反応、発癌性の危険性が指摘され、臨床応用は難しい。

そこで我々はヒト羊膜細胞に着目した。羊膜細胞は、拒否反応、癌化が少ないとされ安全かつ倫理的問題が少ないとされる。また、羊膜自体は角膜損傷をはじめとした臨床の現場ですでに利用されており、羊膜細胞を用いた細胞治療は臨床応用へのハードルをクリアしやすい。さらに羊膜細胞にはいくつかの心筋特異的のマーカが発現していることがわかっており、拍動心筋への分化誘導が可能である可能性が高い。

2. 研究の目的

現行のペースメーカー治療に替わる、新たな治療法として、ヒト羊膜細胞を用いたペースメーカー細胞治療を行うべく、ヒト羊膜細胞からの効率的ペースメーカー細胞への分化誘導・純化する方法を開発することを研究目的とした。

3. 研究の方法

ヒト羊膜間葉系細胞には、先に述べたようにいくつかの心筋特異的のマーカが発現していること、非拍動であるが心筋様細胞への分化誘導が可能であったことが報告されている。より高度に分化した羊膜細胞由来の心筋細胞を得るべく下記方法にて検討した。

(1) 羊膜間葉系細胞より未分化な細胞を単離し心筋分化誘導を図る

未分化状態を維持する転写因子の一つで

ある Nanog に着目し、遺伝子工学的手法を用いて、Nanog 発現細胞を可視化、Nanog 陽性細胞を単離し Nanog 陽性細胞の未分化性を確認するとともに、心筋分化能を Nanog 陰性細胞と比較検討した。

(2) 羊膜間葉系細胞の未分化性を高め心筋分化能を改善させる

羊膜間葉系細胞に未分化状態を維持する転写因子の一つで iPS 細胞作製の際の Key factor である Oct4 を遺伝子導入し、遺伝子導入後の羊膜間葉系細胞の状態を、未分化状態を維持する他の転写因子の発現量を確認し未分化、つまりは多能性に富む状態へと励起されたかを確認する。また Oct4 遺伝子導入後の羊膜間葉系細胞の心筋分化能を、遺伝子非導入群と比較検討する。

4. 研究成果

(1) 羊膜間葉系細胞より未分化な細胞を単離し心筋分化誘導を図る。

① 羊膜間葉系細胞から Nanog 陽性細胞を単離

羊膜間葉系細胞の Nanog 発現は非常に微弱であったため、Nanog 陽性羊膜間葉系細胞を同定するために Cre/loxP system を用いた。Nanog promoter の下流に Cre タンパク遺伝子を組み込んだ plasmid と、CMV promoter の下流に loxP 配列に挟まれた Stop コドンを挿入しさらにその下流に Ds-Red 遺伝子と puromycin 耐性遺伝子を組み込んだ plasmid を各々作成、それぞれを同時に羊膜間葉系細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入 24 時間後に Puromycin を 30 μ M 投与し Nanog 陽性細胞を純化した。遺伝子導入した細胞のうち、本システムで Nanog 陽性となったのは 23.05 \pm 3.80%であった。Nanog 陽性細胞を陰性細胞と比較すると、未分化状態を維持する転写因子である Oct4, Sox2, Nanog, Klf4 の mRNA 量が Nanog 陽性細胞で有意に上昇し、免疫染色では Nanog 陽性細胞で Oct4, Nanog が核で染色されることが明らかになった。

② Nanog 陽性細胞の心筋分化能

Nanog 陽性細胞に 10 μ M の 5-Azacytidine を 24 時間添加、さらに 20%ウシ胎児血清含有培地で培養して分化誘導を促したところ、Nanog 陽性細胞で Nkx2.5, GATA4, hANP, cTnT, Mlc-2a, Mlc-2v, beta-MHC, HCN4, Kir2.1 の発現が RT-PCR にて確認されたが Nanog 陰性細胞では Nkx2.5 と cTnT 以外の心筋マーカーは発現していなかった。

また、免疫蛍光染色法にて羊膜間葉系細胞では Nanog 陽性のは Nkx2.5, cTnT, HCN4, Kir2.1, connexin43 の発現が、Nanog 陰性細胞では Nkx2.5, cTnT, connexin43 のみ発現が認められた。

Nanog 陽性ヒト羊膜間葉系細胞は未分化性が高く、高い心筋分化能を有してした。

自律拍動はみとめられなかったが、HCN4 や Kir2.1 などのチャンネルタンパク質の発現を認めることから、自律的活動電位を発生させる可能性があり、ペースメーカー細胞として働く可能性があることが示された。

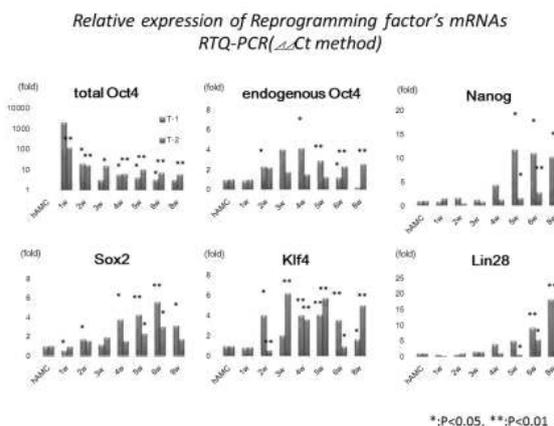
(2) 羊膜間葉系細胞の未分化性を高め心筋分化能を改善させる。

① 羊膜間葉系細胞に Oct4 を遺伝子導入し未分化状態へと励起させる

CMV プロモーター下流に Oct4-ORF を挿入したプラスミドベクターを作成し、羊膜間葉系細胞に電気穿孔法を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入後の未分化状態を維持する転写因子の mRNA 量を real time RT-PCR を用いて遺伝子非導入群と比較すると、遺伝子導入後 Oct4 の総 mRNA 量は経時的に徐々に低下するが、他の転写因子の mRNA 量はこれに反し増加し、内因性 Oct4 mRNA は、遺伝子導入 4 週あるいは 8 週後にピークに至り、それぞれ hAMC の 4.2 \pm 2.2 倍、2.6 \pm 0.2 倍、Nanog のピークは 5 週、6 週後にそれぞれ 11.9 \pm 4.3 倍、2.7 \pm 0.6 倍に至った (Fig. 1)

Fig. 1 羊膜間葉系細胞への Oct4 遺伝子導入後、内因性 Oct4, Nanog, Sox2, Klf4, Lin28

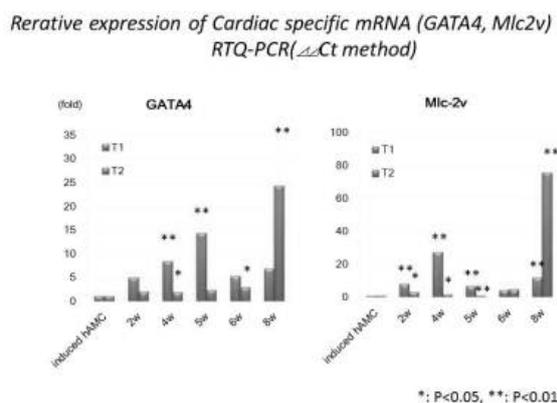
の mRNA 量の変化



② Oct4 遺伝子導入羊膜間葉系細胞の心筋分化誘導

Oct4 発現ベクター導入から 2、4、5、6、8 週間経過した羊膜間葉系細胞に 5-Azacytidine を 10 μ M, 24h 作用させ心筋分化を誘導、遺伝子導入をせずに分化誘導した場合と、心筋特異的 mRNA の発現状況を Real-time RT-PCR 法にて比較したところ、心筋特異的転写因子である GATA4 発現は、hAMC を未処理で分化誘導した場合の 14.4 \pm 5.8 倍、24.3 \pm 8.0 倍に達するとともに、収縮蛋白である Mlc2v の転写も、遺伝子導入 4 週、8 週での誘導で 27.6 \pm 1.8 倍、75.7 \pm 4.5 倍に至った (Fig. 2)。

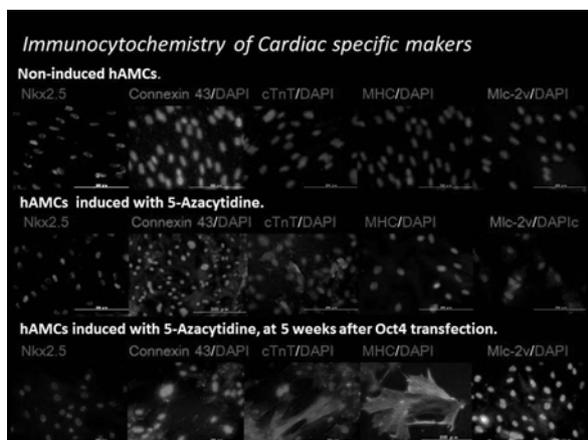
Fig. 2 羊膜間葉系細胞へ Oct4 遺伝子導入後に心筋分化誘導施行したものの心筋特異的 mRNA 発現量の変化



また心筋特異的蛋白の発現状況も免疫細胞染色にて確認したところ、Oct4 遺伝子導入し

た羊膜間葉系細胞では遺伝子導入後4週以降で遺伝子非導入の羊膜間葉系細胞と比較して、明瞭な繊維形態を呈する収縮蛋白質の構造が確認できた。また Connexin43 の発現は分化誘導後も維持された、(Fig. 3)

Fig. 3 羊膜間葉系細胞分化誘導前後における心筋分化マーカー (NKx2.5, Connexin43, cTnT, MHC, Mlc2v) の発現



羊膜間葉系細胞への Oct4 過剰発現により、遺伝子導入後、種々の未分化状態を維持すると、転写因子の mRNA 量が増加し、それに伴い、心筋分化能も改善された。本法においても、拍動心筋には至れなかったが、明瞭な繊維構造を示す収縮蛋白質と細胞周囲に Gap junction を形成しうる、Connexin43 も認められたことから、ひとたび、自律的な活動電位が発生した場合には、隣接する細胞に活動電位を伝搬することができる可能性があり、羊膜間葉系細胞を用いてのペースメーカー細胞の樹立の可能性が高まった。

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)

[学会発表] (計 3 件)

大高慎吾、名倉里織、小池知加、岡部素典、吉田淑子、柳堅徳、三崎拓郎、二階堂敏雄: Nanog 陽性羊膜間葉系細胞の選択的分離と心筋分化誘導、第 9 回 日本再生医療学会総会 (2010 年、広島)

名倉里織、大高慎吾、小池知加、岡部素典、吉田淑子、柳堅徳、深原一晃、三崎拓郎、二階堂敏雄: Oct3/4 の発現の誘導はヒト羊膜間葉系細胞を未分化状態へと励起し心筋分化能を改善する、第 9 回 日本再生医療学会総会 (2010 年、広島)

名倉里織、大高慎吾、深原一晃、芳村直樹、二階堂敏雄、三崎拓郎: 羊膜間葉系細胞における外因性 Oct4 過剰発現はその心筋分化能を改善する。第 111 回 日本外科学会定期学術集会 (2011 年、誌上開催)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三崎 拓郎 (MISAKI TAKUROU)
富山大学・名誉教授
研究者番号: 40092811

(2) 研究分担者

二階堂 敏雄 (NIKAIDOU TOSHIO)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・教授
研究者番号: 50180568

(3) 連携研究者

深原 一晃 (FUKAHARA KAZUAKI)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・講師
研究者番号: 40343180