

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790236

研究課題名(和文)

マーモセットES細胞由来心筋細胞のシート作製と移植

研究課題名(英文)

Fabrication and Transplantation of Common Marmoset ES cells-derived cardiomyocyte sheets

研究代表者

服部 文幸 (HATTORI FUMIYUKI)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：50398624

研究成果の概要(和文):

重症心不全の根本的治療方法として心臓再生医療への期待が高い。実現には、霊長類動物を用いた十分な安全性・有効性の確認が必須である。我々は、霊長類マーモセットのES細胞を初めて心筋細胞へ分化し、諸性質を調査報告した。さらに、独自の心筋細胞精製方法を用い、ES心筋細胞を精製し報告した。続いて精製心筋細胞をシートに形成し、免疫不全マウスの心臓上に移植した。これは世界初の成果である。

研究成果の概要(英文):

We showed that marmoset ES cells could differentiate into cardiomyocytes, and fabricated cardiomyocyte sheet, transplanted it on a heart, and observed well survived cardiomyocyte after four weeks.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医化学一般

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：霊長類、マーモセット、心筋細胞、細胞シート、移植、心臓再生

1. 研究開始当初の背景

1998年ヒト胚性幹細胞(ES細胞)株が樹立されたことで、再生不能臓器に重篤疾患を有する患者達は、新たな希望を持った。中でも心臓においては、拡張型心筋症、ミトコンドリア心筋症など、若年者QOLを極めて悪化させる遺伝病が広く存在する上に、生活習慣の欧米化によって若年層の心血管病罹患率は上昇を続け

ている。これらの社会的背景において、益々根本的治療方法としての心臓再生医療への期待が高まっている。

京都大学の中山らは、マウス体細胞に数種類の遺伝子を導入することによって、ES細胞と同等の多能性幹細胞を作出することに成功した。将来的には、個人の体細胞に由来するオーダーメイドES細胞が、倫理的問題を回避し作製できる可能性が

ある。

しかし、再生医療はこれだけでは実現できない。非ヒト霊長類動物を用いた、十分な安全性・有効性の確認が必須である。

2. 研究の目的

我々はこれまでオリジナルのシート技術であるフィブリン法 (Artif Organs 2005;29:95-103) を用いてラット初代心筋細胞シートを作製し、免疫不全マウスの皮下に移植することに成功した。この心筋シートは、移植後も自律拍動能を保ち、毛細血管の浸潤も受け入れていた。さらに、ラット初代心筋細胞シートを、心臓表面の熱的傷害モデルへ移植することによって、心臓活動電位の伝播が正常に近づくことを見出し、初期的な治療モデルとして発表した (Circ Res. 2006 Mar 17;98(5):705-12. Epub 2006 Feb 9.)。本研究ではこれらの成果を応用し、さらに、新規の心筋細胞精製方法 (服部ら投稿中。2007 年米国心臓学会・2007 年日本循環器学会で発表済み) を組み合わせ、精製マーマセット ES 細胞由来心筋細胞の細胞シートを作製し、電気伝導不全に対する治療モデルの構築を目指す。

3. 研究の方法

(1)CMESCs 由来心筋細胞の増殖能を詳細に解析する。

長期にわたるマーマセット ES 細胞由来心筋細胞の観察から、この細胞がマウス ES 細胞由来心筋細胞に比べて長期間増殖能を維持できる可能性が示唆された。ゲノム複製の指標である BrdU 取り込みおよび、細胞数の計測、細胞質分裂の確認などさらに詳しく解析を行い、霊長類 ES 細胞由来心筋細胞の増殖性に関する重要知見を蓄積する。

(2)CMESCs 由来心筋細胞の電氣的活動を解析し、心房心室筋等への分化・成熟過程を明らかにする。

微小電極法を用いて、マーマセット心筋細

胞の活動電位を測定する。

(3)心筋細胞シートの移植。

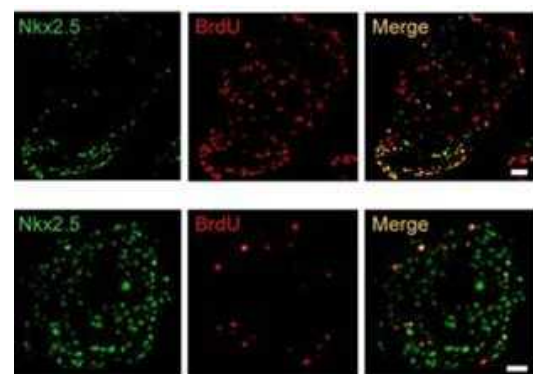
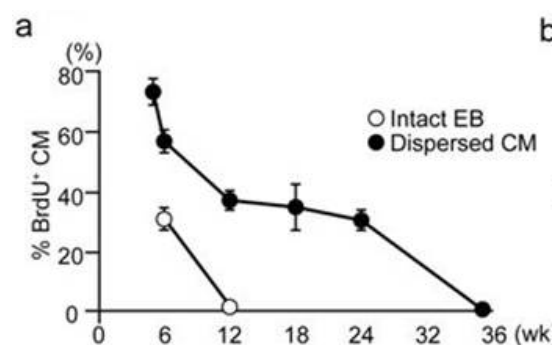
フィブリン法を用いて作製した心筋細胞シートを免疫不全マウスの心臓に移植し生着させる。

4. 研究成果

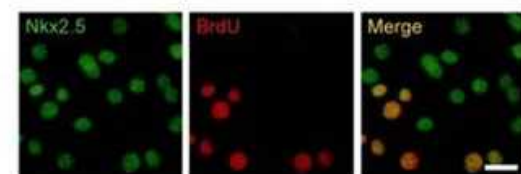
(1)細胞増殖について

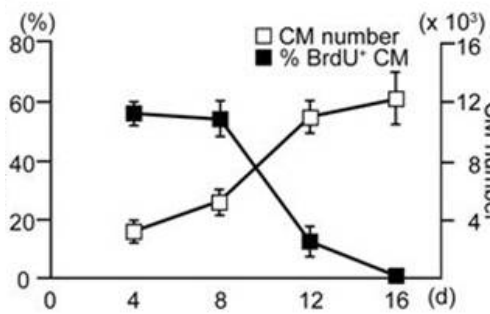
胚様体の内部に存在する心筋細胞は、分化開始後 12 週で完全に DNA 合成を停止したが、この胚様体から心筋細胞を単離精製し、分化開始後 6 週から 24 週 (6 ヶ月) まで、心筋細胞は分裂増殖能を示した (図 1)。それぞれから分取した心筋細胞は、分取時期によらず同様に 2 週間程増殖を継続し、細胞数で 4 倍強に増える能力を維持していた (図 2)

(図 1)



(図 2)

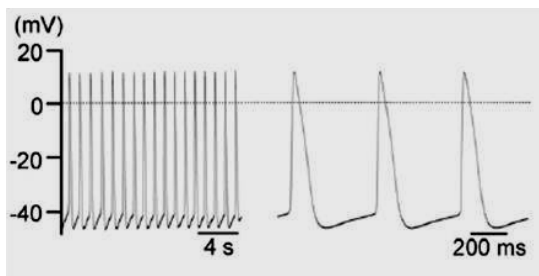




(2)心筋細胞の活動電位に関して

微小電極法を用いて、マーモセット心筋細胞の活動電位を測定したところ、多くは自動能を有する「幼若心筋型」波形を示した(図3)。しかし、シート状に形成した心筋細胞の多くは、自動能を示さなかった。これは、心筋細胞を精製し心筋細胞だけのシートを形成すると、心筋細胞の多くが細胞外部からの刺激に反応して拍動する受動能を獲得することを示す。

(図3)

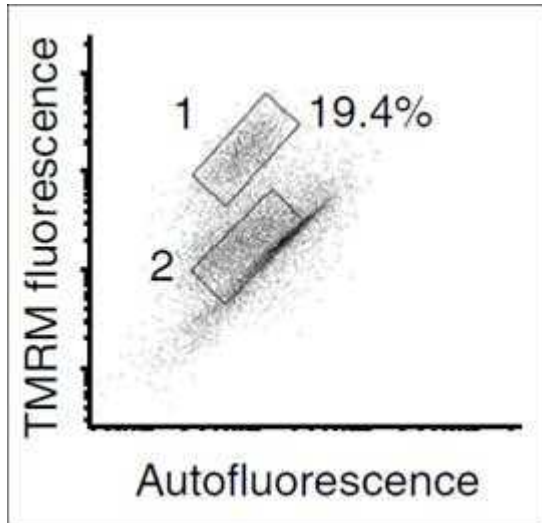


(3)筋細胞シートの移植

マーモセット ES 細胞に由来する心筋細胞をミトコンドリア法で精製した(図4)。この10の6乗個以上の心筋細胞を用いて、フィブリン膜上にシートを形成した(図5)。この心筋細胞シートをフィブリンが自己消化されることにより薄利することに成功した。このシートをメッシュストリップの上に移し、さらに開胸したマウス心臓上に静置した。移植したマウスを焼く4週間飼育し、心臓を回収した。心臓の切片を作製したところ、心筋細胞シートが心臓上に強固に結合していた。心筋細胞の走行は心臓の外周に沿った方向性に並んでおり、心筋細胞シートがホスト心臓

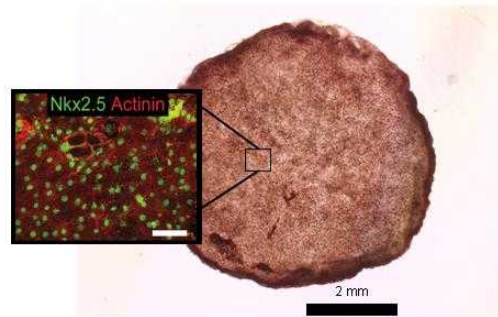
の収縮を阻害せず、補助することが可能ではないかと推察された。

(図4)



(図5)

精製マーモセットES細胞由来心筋細胞シート



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2件)

1: Hattori F, Fukuda K. Strategies for ensuring that regenerative cardiomyocytes function properly and in cooperation with the host myocardium. *Exp Mol Med*. 2010 Mar 31;42(3):155-65.(査読有)

2: Chen H, Hattori F, Murata M, Li W, Yuasa S, Onizuka T, Shimoji K, Ohno Y, Sasaki E, Kimura K, Hakuno D, Sano M, Makino S, Ogawa S, Fukuda K. Common marmoset embryonic stem cell can differentiate into cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 May 9;369(3):801-6. (査読有)

〔学会発表〕(計1件)

第55回未来医療センターセミナー 2010年7月20日 大阪大学
服部文幸 心臓再生医療の実現を目指した、心筋細胞精製および効率的移植方法の開発

〔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

服部 文幸 (HATTORI FUMIYUKI)
慶應義塾大学・医学部・研究員
研究者番号：50398624

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし