

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21390239

研究課題名（和文）

ES 及び iPS 細胞による新しい種子-土壌（シード&ソイル）心筋再生治療戦略の開発

研究課題名（英文） Development of a novel “Seed and Soil” cardiac regenerative strategy with ES/iPS 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（和文）：本研究は、心筋再生に最適な移植細胞の誘導・純化・移植法の開発（seed 開発）とその seed を特異的に心筋へと誘導する因子・環境（soil）の解明を通じて、高効率な新しい心筋再生治療戦略、「Seed & Soil 治療」の開拓・樹立を行うことを目的とする。1）サイクロスポリン A の心筋前駆細胞分化促進作用の分子機構の解析。2）心筋前駆細胞（FCV 細胞）のモデル動物への移植実験。3）低分子化合物ライブラリー（海洋生物由来）から「心筋前駆細胞から心筋細胞」の分化過程作用する新規心筋再生促進物質の探索を行った。サイクロスポリン A を用いたヒト iPS 細胞からの機能心筋細胞の誘導（PLoS One, 2011a）、新しいヒト iPS 細胞心筋分化誘導法及び純化法（PLoS One, 2011b）、ES 細胞由来心筋細胞シート移植による心筋梗塞後の機能改善（Stem Cells, 2012）、新しい海洋生物由来心筋分化促進化合物の同定に成功し、Seed & Soil 治療法開拓の基本的技術基盤構築に成功した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we tried to develop a new efficient cardiac regenerative strategy with a combinatory exploration of transplantable cell sources (seeds) and efficient differentiation environments (soil). We succeeded in inducing cardiomyocytes from human iPS cells using cyclosporin-A (PLoS One, 2011a), developing an efficient differentiation method and purification method for cardiomyocytes from human iPS cells (PLoS One, 2011b). We also showed the potentials and mechanisms of cardiac tissue sheet transplantation in cardiac function after myocardial infarction. Transplantation of the cardiac tissue sheet to a rat myocardial infarction model showed significant and sustained improvement of systolic function accompanied by neovascularization (Stem Cells, 2012). Currently, we identified a novel small compound from marine sponge showing potent cardiomyocyte inducing effect. Thus, we succeeded in establishing a technological basis for “Seed and soil” cardiac regenerative strategy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
22 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
23 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：循環器内科学

キーワード：ES細胞, iPS細胞, 心臓再生, 心筋分化, サイクロスポリンA, 細胞シート

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ってきた。すなわち、ES細胞からFlk1(2型VEGF受容体)陽性細胞、さらには血管を分化誘導する新しい*in vitro*分化誘導系を開発した(Yamashita, Nature, 2000)。心筋に関しては、単一細胞から心筋細胞を誘導できる新しい分化誘導システムを構築し、高い心筋特異性を有する新しい心筋前駆細胞(FCV細胞)の同定・純化に成功した(FASEB J, 2005)。最近、免疫抑制剤サイクロスポリンAが強力な心筋及び心筋前駆細胞誘導効果を有することを明らかにした(Yan, Biochem Biophys Res Commun, 2009)。マウスiPS細胞から系統的に様々な心血管細胞を分化誘導することにも世界に先駆けて成功した(Narazaki, Circulation, 2008)。これらの先端的成果・技術を有機的に統合し応用することにより、細胞(種子seed)と微小環境(土壌soil)の双方を制御して効率的再生を促す新たなモードの再生治療戦略の開発ができると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、心筋再生に最適な移植細胞の誘導・純化・移植法の開発(seed開発)とそのseedを特異的に心筋へと誘導する因子・環境(soil)の解明を通じて、高効率な新しい心筋再生治療戦略、「Seed & Soil治療」の開拓・樹立を行うことを目的とする。1) サイクロスポリンAの心筋前駆細胞分化促進作用の分子機構の解析。2) 心筋前駆細胞(FCV細胞)のモデル動物への移植実験。3) 低分子化合物ライブラリー(海洋生物由来)から「心筋前駆細胞から心筋細胞」の分化過程作用する新規心筋再生促進物質の探索を行う。以上の研究により、「Seed & Soil治療法」という概念を確立する。

3. 研究の方法

(1) サイクロスポリンA(CSA)の心筋・心筋前駆細胞分化誘導の分子機構の解析

① サイクロスポリンA投与時における網羅的遺伝子発現比較

② サイクロスポリンA投与時におけるプロテオーム解析

これらの解析により、サイクロスポリンAの心筋分化促進作用の分子機構を解明する。

(2) ES/iPS細胞由来心臓細胞の効率的移植方法の開発

細胞シート(Miyahara, Nat Med, 2006)技術を用い、心臓組織シートを形成し、ラット心筋梗塞モデルへの移植を行う。

(3) 海洋生物由来低分子化合物ライブラリーからの心筋分化誘導物質の探索

新規生理活性物質の宝庫である海洋生物由来低分子化合物ライブラリー(中尾准教授より提供)をスクリーニングし、新規心筋分化誘導物質の同定を試みる。特に、分化最終段階に作用する新しい物質を重点的に探索する。

4. 研究成果

(1) CSAの下流分子探索に関しては、CSAの免疫抑制作用の標的分子であるカルシニューリン及びNFATは、心筋分化誘導活性には関与せず、他の分子標的の探索が必要となったが、最終的に該当する分子は同定できていない。CSA法をヒトiPS細胞の心筋分化に適用し、MummeryらによるEND2細胞との共培養法(Mummery, Circulation, 2003)を応用したヒトiPS細胞培養において、ヒトiPS細胞からの拍動心筋コロニーが約4倍余り増加した。ヒトiPS細胞からの機能的心筋細胞誘導の効率化に成功した(Fujiwara, PLoS One, 2011a)

(2) マウスES細胞から誘導・純化した心筋・血管内皮・血管壁細胞を細胞シート技術(東京女子医大)を用いて再構成し、心臓組織の構成を模したシートを作製、ラット心筋梗塞モデルに移植することにより心機能改善効果を認めた(Masumoto, Stem Cells, 2012)。ヒトiPS細胞に関しても、Lafammeらの方法を改変し、効率的(>60-70%)ヒト心筋分化法及び細胞表面マーカーVCAM1を用いた心筋純化法を開発(Uosaki, PLoS One, 2011b)。ヒトiPS細胞からの同様のシートの作製及び大型化(径3-4cm)に成功し、ラット及びブタ心筋梗塞モデルへの移植実験へ移行中である(京都大学心臓血管外科と共同研究)。新規細胞治療法の開発が進んでいる。

(3) 心筋特異的(alpha MHCプロモーター)GFP発現マウスES細胞を用いて心筋分化誘導活性のHTS系を構築し、新規化合物の探索を行った。海洋生物由来天然化合物ライブラリーから、CSAの1000倍以上低濃度で作用する強力な心筋分化誘導物質CDC#1をすでに同定している。CDC#1は成体内の心筋前駆細胞の一つである心臓SP細胞に対しても作用し、心筋分化誘導活性を示した。CDC#1はすでに全合成が可能となっており、構造-活性相関解析を開始している。ラット心筋梗塞モデルへの投与実験も開始している。

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)

- ① Masumoto H, Matsuo T, Yamamizu K, Uosaki H, Narazaki G, Katayama S, Marui A, Shimizu T, Ikeda T, Okano T, Sakata R, Yamashita JK.
Pluripotent stem cell-engineered cell sheets re-assembled with defined cardiovascular populations ameliorate reduction in infarct heart function with cardiomyocyte-mediated neovascularization.
Stem Cells, 2012, 30:1196-1205, 査読有
DOI:10.1002/stem.1089. [Epub ahead of print]
- ② Yamamizu K, Fujihara M, Tachibana M, Katayama S, Takahashi A, Hara E, Imai H, Shinkai Y, Yamashita JK.
Protein kinase A determines timing of early differentiation through epigenetic regulation with G9a.
Cell Stem Cell, in press, 査読有
- ③ Uosaki H, Fukushima H, Takeuchi A, Matsuoka S, Nakatsuji N, Yamanaka S, Yamashita JK.
Efficient and scalable purification of cardiomyocytes from human embryonic and induced pluripotent stem cells by VCAM1 surface expression.
PLoS One, 2011, 6:e23657, 査読有
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21876760>
- ④ Fujiwara M, Yan P, Otsuji TG, Narazaki G, Uosaki H, Fukushima H, Kuwahara K, Harada M, Matsuda H, Matsuoka S, Okita K, Takahashi K, Nakagawa M, Ikeda T, Sakata R, Mummery CL, Nakatsuji N, Yamanaka S, Nakao K, Yamashita JK.
Induction and enhancement of cardiac cell differentiation from mouse and human induced pluripotent stem cells with cyclosporin-A.
PLoS One, 2011, 6:e16734, 査読有
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21364991>
- ⑤ Suzuki H, Shibata R, Kito T, Ishii M, Li P, Yoshikai T, Nishio N, Ito S, Numaguchi Y, Yamashita JK, Murohara T, Isobe K.
Therapeutic angiogenesis by transplantation of induced pluripotent stem cell-derived Flk-1 positive cells.
BMC Cell Biol, 2010, 11:72, 査読有
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20860813>
- ⑥ Yamashita JK.
ES and iPS cell research for cardiovascular regeneration.
Exp Cell Res, 2010, 316:2555-2559, 査読有
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20385126>
- ⑦ Sasaki D, Shimizu T, Masuda S, Kobayashi J, Itoga K, Tsuda Y, Yamashita JK, Yamato M, Okano T.

Mass preparation of size-controlled mouse embryonic stem cell aggregates and induction of cardiac differentiation by cell patterning method.

Biomaterials, 2009, 30:4384-4389, 査読有
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19487020>

- ⑧ Kuratomi S, Ohmori Y, Ito M, Shimazaki K, Muramatsu S, Mizukami H, Uosaki H, Yamashita JK, Arai Y, Kuwahara K, Takano M.

The cardiac pacemaker-specific channel Hcn4 is a direct transcriptional target of MEF2.

Cardiovasc Res, 2009, 83:682-687, 査読有
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19477969>

[学会発表] (計43件)

- ① Masumoto H, Ikeda T, Shimizu T, Okano T, Sakata R, Yamashita JK.
Generation of Cardiac Tissue Sheets Fully Engineered with Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiovascular Cell Populations.
第76回日本循環器学会総会, 2012/3/16, 福岡
- ② Masumoto H, Shimizu T, Ikeda T, Okano T, Sakata R, Yamashita JK.
Therapeutic potential and mechanisms of tissue sheets re-assembled with defined cardiovascular populations from pluripotent stem cells.
第9回心血管幹細胞研究会, 2012/1/13, 広島
- ③ 山下潤
ES/iPS細胞とケミカルバイオロジー—新しい心臓再生治療における低分子化合物のポテンシャル—
早稲田大学先進理工学部講演会, 2011/12/20, 東京
- ④ 山下潤
ES・iPS細胞を用いた心臓再生の試み
第15回日本心不全学会シンポジウム「心不全における再生治療 up to date」
2011/10/14, 鹿児島
- ⑤ Masumoto H, Shimizu T, Ikeda T, Okano T, Sakata R, Yamashita JK.
Central Role of Cardiomyocytes in Cell Therapy: Transplantation of Cardiac Tissue Sheets with Defined Cell Populations from Pluripotent Stem Cells.
European Society of Cardiology (ESC) Congress, 2011/8/30, Paris, France
- ⑥ Yamamizu K, Matsunaga T, Katayama S, Yamashita JK.
PKA - CREB pathway initiates endothelial and hematopoietic cell differentiation through Etv2 induction.
The 9th Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology, 2011/8/24-27, Busan,

- ⑦ Korea
Yamashita JK.
 Cardiovascular regeneration with ES & iPS cells.
 The 8th Korea-Japan Joint Symposium of Vascular Biology, 2011/8/25, Busan, Korea
- ⑧ 升本英利, 清水達也, 池田義, 岡野光夫, 坂田隆造, 山下潤
 Embryonic Stem (ES) Cell-engineered Tissue Sheets with Defined Cardiac Cell Populations Ameliorate Function after Myocardial Infarction.
 第75回日本循環器学会総会, 2011/8/3, 横浜
- ⑨ Uosaki H, Yamashita JK.
 VCAM1 as a Specific Marker for Cardiomyocytes from Human Embryonic and induced Pluripotent Stem Cells.
 Bassetlaw Community and Voluntary Service, 2011/7/19, New Orleans, USA
- ⑩ Uosaki H, Yamashita JK.
 Cardiomyocyte Proliferating Chemicals: Activation of Proliferation of ESC/iPSC-derived Cardiomyocytes.
 Bassetlaw Community and Voluntary Service, 2011/7/18, New Orleans, USA
- ⑪ 升本英利, 池田義, 坂田隆造, 山下潤
 多能性幹細胞由来心臓組織シートによる虚血性心疾患治療への挑戦
 第9回メタボリックシンドロームカンファレンス, 2011/7/16, 京都
- ⑫ 山下潤
 心臓再生へ向けた多面的アプローチ～ES/iPS細胞を用いた創薬研究と細胞治療～, 文部科学省私立大学学術高度化推進事業 ハイテクリサーチセンター整備事業・第4回シンポジウム, 2011/6/25, 東大阪
- ⑬ Masumoto H, Ikeda T, Sakata R, Yamashita JK.
 Mouse embryonic stem cell-engineered tissue sheets with defined cardiac cell populations ameliorate function after myocardial infarction.
 The 9th International Society for Stem Cell Research (ISSCR), 2011/6/17, Toronto, Canada
- ⑭ 升本英利, 池田義, 清水達也, 岡野光夫, 坂田隆造, 山下潤
 マウス多能性幹細胞由来心臓組織シートの心筋梗塞後リモデリング抑制効果
 第32回日本炎症・再生医学会, 2011/6/11, 京都
- ⑮ 山下潤
 ES/iPS細胞を用いた再生医-心臓再生を中心にして
 神戸薬科大学 第37回卒後研修講座
 2011/6/5, 神戸
- ⑯ 山下潤
 iPS細胞の基礎と応用
 再生医療学会エデュケーショナルセミナー, 2011/5/31, 東京
- ⑰ 山下潤
 心臓再生へ向けた多面的アプローチ～ES/iPS細胞を用いた細胞治療と創薬研究～, 第24回北摂循環器研究会, 2011/5/24, 吹田
- ⑱ Yamashita JK.
 Development of cardiac regeneration strategies with pluripotent stem cells.
 JST/CIRM Workshop. “Early Translational Research on Stem Cells”, 2011/5/16, Kobe, Japan
- ⑲ 魚崎英毅, 福島弘之, 中尾洋一, 山下潤
 低分子化合物によるES/iPS細胞由来心筋細胞の分化および増殖制御-再生医療へのケミカルバイオロジー-
 第10回日本再生医療学会, 2011/3/1, 東京
- ⑳ Yamashita JK.
 Pluripotent stem cell research for cardiovascular cell differentiation and regeneration.
 The 14th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference, “Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells: Derivation and Characterization”, 2011/2/24, Bethesda, USA
- ㉑ 山下潤
 ES及びiPS細胞を用いた心血管分化再生研究, 芝蘭会産学情報交流会, 2011/2/7, 京都
- ㉒ Yamamizu K, Katayama S, Tachibana M, Shinkai Y, Yamashita JK.
 Protein kinase A accelerates early ES cell differentiation through epigenetic inhibition of Oct3/4 and Nanog expression.
 Stem Cells in Development, Tissue Homeostasis and Disease - Keystone Symposia, 2011/1/31-2/4, New Mexico, USA
- ㉓ 魚崎英毅, 山下潤
 Cardiomyocyte Proliferating Chemicals: Chemical biology on proliferation of cardiomyocyte from embryonic and induced pluripotent stem cells.
 第6回心血管幹細胞研究会, 2011/1/15, 東京
- ㉔ 山水康平, 古田貞由, 片山志織, 成田道子, 葛巻直子, 今井哲司, 長瀬博, 鈴木勉, 成田年, 山下潤
 血管形成におけるオピオイドの新しい役割, 再生医科学研究所学術講演会2010 (ポスター), 2010/12/13, 京都
- ㉕ 山水康平, 古田貞由, 片山志織, 成田道子, 葛巻直子, 今井哲司, 長瀬博, 鈴木勉, 成田年, 山下潤
 発生過程の血管内皮細胞分化および血管走行におけるオピオイドの役割, 第33回日本分子生物学会年会, 2010/12/10, 神戸
- ㉖ Yamashita JK.
 Dual roles of cAMP pathway in endothelial cell differentiation and specification.
 The 8th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology, 2010/12/3, Osaka, Japan
- ㉗ Uosaki H, Fujiwara M, Yamashita JK.
 Small molecules inducing robust proliferation of embryonic stem cell or induced pluripotent stem

cell-derived cardiomyocytes.
American Heart Association scientific session (poster), 2010/11/17, Chicago, USA

- ⑳ 山下潤
iPS 細胞の心筋再生への応用
日本心不全学会シンポジウム「心筋細胞再生の現状と展望」
2010/10/8, 東京
- ㉑ 山下潤
iPS 細胞研究で未来を探る－新しい心臓血管再生治療の可能性－
JST イノベーションサテライト高知研究成果報告会 (特別講演), 2010/9/9, 高知
- ㉒ 山下潤
ES・iPS 細胞を用いた心血管再生の試み
日本心血管インターベンション治療学会シンポジウム「再生医療でここまでできる」, 2010/8/22, 仙台
- ㉓ 福島弘之, 魚崎英毅, 山下潤
ES 細胞を用いた心筋分化を促進する化合物の探索
第 31 回日本炎症・再生医学会 (ポスター), 2010/8/5, 東京
- ㉔ Yamashita JK.
Systematic cardiovascular cell differentiation from iPS cells.
Annual Symposium of the American Heart Association, Basic Cardiovascular Science, 2010/7/22, California, USA
- ㉕ Uosaki H, Yamashita JK.
Chemical biological approach to enhance proliferation of cardiomyocytes derived from embryonic stem cells.
International Society for Stem cell Research 8th Annual meeting (poster), 2010/6/18, San Francisco, USA
- ㉖ Yamashita JK.
The race for the implantable cardiomyocyte: who is winning? XXth World Congress of the International Society for Heart Research 2010 Kyoto. Induced pluripotent stem cells? Symposium, 2010/5/14, Kyoto, Japan
- ㉗ 山下潤
「ES 細胞・iPS 細胞を用いた血管分化多様化機構の解析－血管における cAMP シグナルの新しい意義－」
第 33 回日本血栓止血学会学術総会日本血管生物医学会ジョイントシンポジウム
2010/4/23, 鹿児島
- ㉘ 魚崎英毅, 山下潤
低分子化合物を用いた ES 細胞由来心筋細胞の分化・増殖制御
第 9 回日本再生医療学会総会, 2010/3/18, 広島
- ㉙ Uosaki H, Yamashita JK.
Small Molecules Regulating Differentiation and Proliferation of Embryonic Stem Cell-derived Cardiomyocytes.
74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2010/3/7, Kyoto
- ㉚ Uosaki H, Yamashita JK.
Expanding embryonic stem cell-derived

cardiomyocytes by small molecules.
Keystone symposia (Cardiovascular Development and Repair) (poster), 2010/3/3, Colorado, USA.

- ㉛ Yamashita JK.
Cardiovascular cell differentiation and diversification from ES and iPS cells.
KSMBMB 2009 Annual International Conference, Symposium “Cardiogenesis, Angiogenesis, and Lymphangiogenesis”
2009/10/29-30, Seoul, Korea
- ㉜ Yamashita JK.
iPS cells for cardiovascular research. JSPS presents, Sweden - Japan Joint Colloquium, “Advances in Cellular Reprogramming and Stem Cell Biology”
2009/9/5, Stockholm, Sweden
- ㉝ Yamashita JK.
Vascular cell differentiation & diversification from ES and iPS cells. The 7th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology, 2009/8/20-21, Seoul, Korea
- ㉞ Yamashita JK.
Cardiovascular cell differentiation from ES and iPS cells.
EMBO Workshop, Lymphatic and Blood Vasculature: from models to human disease, 2009/6/4-5, Helsinki, Finland
- ㉟ 山下潤
ES 細胞及び iPS 細胞を用いた血管分化・多様化・再生機構の解析
日本内分泌学会シンポジウム「血管新生と心血管系内分泌の新展開」,
2009/4/23-25, 前橋

[図書] (計 2 件)

- ① Yamamizu K, Yamashita JK., Shin-Ichi Nishikawa.
“Potential of ES Cell Differentiation Culture for Vascular Biology”
Handbook of Stem Cells, in press
Publisher: Academic Press Inc
- ② Uosaki H, Yamashita JK.
Chemicals Regulating Cardiomyocyte Differentiation.
Embryonic Stem Cells: The Hormonal Regulation of Pluripotency and Embryogenesis, 2011, Chapter 24:471-486
Publisher: InTech.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: The method of producing the group of cells containing cardiomyocytes and vascular tissue cells
発明者: 山下潤 / 升本 英利
権利者: 京都大学
種類: 特許
番号: 61/611,340
出願年月日: 2012/3/15
国内外の別: 国外

○取得状況（計0件）

〔その他〕

研究者番号：
ホームページ等
<http://maxim2.frontier.kyoto-u.ac.jp/es>

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

(3) 連携研究者

なし