

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2014

課題番号：22390072

研究課題名(和文) ヒト心筋分化誘導因子の同定 - 細胞医療を視野に入れた複合治療戦略の創成 -

研究課題名(英文) Identification of cardiomyogenic factor in terms of cell-based therapy/regenerative medicine

研究代表者

梅澤 明弘 (Umezawa, Akihiro)

独立行政法人国立成育医療研究センター・再生医療センター・センター長

研究者番号：70213486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：成体内のさまざまな臓器由来の間葉系幹細胞株を確立し、細胞寿命の延長に関わる遺伝子を導入して細胞の増殖能の増加、寿命の延長を検討した。間葉系細胞を効率よく心筋細胞に分化させる因子を網羅的に分析し、その一部としてGrem1が同活性を有していることを発表した。高い心筋分化効率を有する間葉系幹細胞株にのみ強発現している遺伝子をMicroArray法により同定し、CD29<sup>high</sup> CD34<sup>low</sup> c-kit<sup>+</sup> CD140a<sup>+</sup>に着目し、細胞の検証を行い間葉系幹細胞から心筋細胞に分化しやすい細胞を選択する方法を確立した。間葉系細胞の傷害心筋へのin vivo移植実験を行い、心筋細胞補充療法の基盤を確立した。

研究成果の概要(英文)：We examined mesenchymal cells with an extended life span to investigate cardiomyogenic factors comprehensively. Among the mesenchymal cells, we focused on CD29-high CD34-low c-kit-positive CD140a-positive cells, and established a method to select cells capable of differentiating into cardiomyocytes in a high frequency. We implanted mesenchymal cells derived from a series of tissues including placenta into injured hearts. We herewith report to generate an experimental design to obtain proof of concept in a pre-clinical setting for cell-based therapy using tissue-derived mesenchymal cells to injured hearts.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：細胞・組織 タンパク質 心筋再生 液性因子 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

心不全・心筋梗塞の新しい治療法として再生治療が注目されている。現在、骨格筋芽細胞、骨髄細胞、内皮前駆細胞による細胞移植が臨床試験中であるが、臨床的に十分な数の心筋細胞と血管の両者を再生する方法は確立されていない。細胞移植治療の際の移植細胞のうち、ES細胞は容易に心筋細胞に分化するが、免疫的拒絶や奇形腫形成の問題がある。骨格筋芽細胞は心筋ではないため効率の良い収縮は望めない。骨髄単核球細胞、内皮前駆細胞移植は心筋細胞に分化する効率は低く、左室機能の改善は血管新生やアポトーシス抑制効果によると考えられている。遺伝子導入により細胞寿命を延長したヒト骨髄間葉系細胞はヒト胎児心筋細胞との共培養により心筋細胞に形質転換した。しかしながら、遺伝子導入やヒト胎児心筋細胞との共培養は臨床における細胞移植治療では実際的ではない。そこで、間葉系細胞を単独で効率よく心筋細胞に分化させるためには強力な心筋分化誘導因子が必要であるという着想に至った。

我々は UBET 細胞が ES 細胞や P19CL6 細胞株を高率に心筋細胞に分化させる分泌因子を産生していることを発見し、2つの蛋白質を同定し国際誌に発表した(Zhu et al. Nature, 2008; Kami et al. PLoS One, 2008)。本研究では骨髄間葉系細胞、心筋幹細胞を心筋細胞に分化誘導する因子と、血管新生を促進する因子を単離精製し、非侵襲的な心血管分化誘導療法の確立を目的とする。申請者は本研究で UBET 細胞から分泌される因子について質量分析、シグナルシーケンストラップ

法 (SST 法) などにより、網羅的に分析し、骨髄間葉系細胞を効率よく心筋細胞に分化させる因子を複数精製する。具体的には、様々な臓器由来のヒト間葉系幹細胞株を樹立して *in vitro* において心筋に分化させ、より効率よく多量の分化心筋細胞を獲得する手法を確立する。血管新生をモニターできるマウスに分化心筋細胞を移植し、移植後の心筋再生と血管再生の機構を検証し、心筋移植後の血管再構築を促すサイトカインや増殖因子を同定する。

## 2. 研究の目的

心不全・心筋梗塞の新しい治療法として再生治療が注目されている。現在、骨格筋芽細胞、骨髄細胞、内皮前駆細胞による細胞移植が臨床試験中であるが、臨床的に十分な数の心筋細胞と血管の両者を再生する方法は確立されていない。我々は UBET 細胞が ES 細胞や P19CL6 細胞株を高率に心筋細胞に分化させる分泌因子を産生していることを発見し、その蛋白質の一つを同定した。本研究では骨髄間葉系細胞、心筋幹細胞を心筋細胞に分化誘導する因子と、血管新生を促進する因子を単離精製し、非侵襲的な心血管分化誘導療法の確立を目的とする。本研究において、様々な臓器由来のヒト間葉系幹細胞株から効率よく多量の分化心筋細胞を獲得する方法の確立、骨髄間葉系細胞を心筋細胞に分化誘導する分泌分子の単離精製と臨床応用を目指した *in vivo* での効果の検討、心臓幹細胞である心臓 Side population (SP) 細胞の心筋細胞への分化誘導、移植組織の血管新生の機序と促進因子の同定、を目的とし研究を遂行する。

### 3. 研究の方法

間葉系細胞を効率よく心筋細胞に分化させる因子を質量分析、シグナルシークエンストラップ法 (SST 法) などにより網羅的に分析し、複数精製した。さらに、高い心筋分化効率を有する間葉系幹細胞株にのみ強発現している遺伝子を MicroArray 法により同定し、間葉系幹細胞から心筋細胞に分化しやすい細胞を選択する方法を検討した。精製した心筋誘導因子により心筋細胞に分化させた骨髄間葉系細胞や、心筋誘導因子の遺伝子導入を行った骨髄間葉系細胞の傷害心筋への *in vivo* 移植実験を行い、心筋細胞補充療法の基盤を確立する。次にヒトを含む種々の動物種に存在する幹細胞分画である SP 細胞を心臓から単離し、成熟した心筋細胞に分化させて *in vitro* 心筋幹細胞分化モデルを作成する。また、心臓 SP 細胞をモデル動物に経静脈的に移植し、傷害心筋へのホーミング、心筋細胞への分化について検討する。血管新生をモニターできるマウスに分化心筋細胞を移植し、移植後の心筋再生と血管再生の機構を検証し、心筋移植後の血管再構築を促すサイトカインや増殖因子について検討した。

### 4. 研究成果

成体内のさまざまな臓器由来の間葉系幹細胞株を確立し、細胞寿命の延長に関わる遺伝子を導入して細胞の増殖能の増加、寿命の延長を検討した。また、間葉系細胞を効率よく心筋細胞に分化させる因子を質量分析、シグナルシークエンストラップ法 (SST 法) により網羅的に分析した。その一部として既に *Grem1* 及び *IGF-BP-4* が同活性を有していることを発表した。高い心筋分化効率を有する間葉

系幹細胞株にのみ強発現している遺伝子を MicroArray 法により同定し、*CD29<sup>high</sup> CD34<sup>low</sup> c-kit<sup>+</sup> CD140a<sup>+</sup>* に着目し、細胞の検証を行い、間葉系幹細胞から心筋細胞に分化しやすい細胞を選択する方法を確立した。精製した心筋誘導因子により心筋細胞に分化させた骨髄間葉系細胞や、心筋誘導因子の遺伝子導入を行った骨髄間葉系細胞の傷害心筋への *in vivo* 移植実験を行い、心筋細胞補充療法の基盤を確立した。

### 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 件)

Kami D, Kitani T, Kishida T, Mazda O, Toyoda M, Tomitaka A, Ota S, Ishii R, Takemura Y, Watanabe M, Umezawa A, Gojo S. Pleiotropic functions of magnetic nanoparticles for *ex vivo* gene transfer. *Nanomedicine*. 10(6):1165-74, 2014.

Kami D, Watakabe K, Yamazaki-Inoue M, Minami K, Kitani T, Itakura Y, Toyoda M, Sakurai T, Umezawa A, Gojo S. Large-scale cell production of stem cells for clinical application using the automated cell processing machine. *BMC Biotechnol*. 13(1):102, 2013.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

梅澤明弘 (UMEZAWA AKIHIRO)

独立行政法人国立成育医療研究センター  
再生医療センター・センター長

研究者番号：70213486

(2)研究分担者

黒田雅彦 (KURODA MASAHIKO)  
東京医科大学・病理学教室・教授  
研究者番号：80251304

豊田雅士 (TOYODA MASASHI)  
地方独立行政法人東京都健康長寿医療セ  
ンター・研究所老年病研究チーム・研究副  
部長

(3)連携研究者

なし