

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 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590813

研究課題名（和文） ヒト人工多能性幹細胞を用いた心筋分化メカニズムの解明および細胞移植療法への最適化

研究課題名（英文） Phenotypic analyses for differentiation of human iPS cells into cardiomyocytes

研究代表者

村田 光繁 (MURATA MITSUSHIGE)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30317135

研究成果の概要（和文）：ヒト iPS 細胞は、心筋分化後早期に分子生理学および電気生理学的に結節型細胞の表現型が優位であるが、分化後後期には作業心筋型表現型に変化することが明らかとなった。これは、再生心筋細胞が培養中に成熟し、その表現型を変化する可能性を示唆しており、再生心筋の臨床応用の際にはその目的や手段によって用いる細胞を使い分ける必要がある。

研究成果の概要（英文）：Human iPS-derived cardiomyocytes showed the nodal phenotypic features in molecular biological and electrophysiological analyses at the early period of differentiation, whereas they showed ventricular and atrial phenotypes at the late period. These results implicate the maturation of regenerative cardiomyocytes during culture, and the necessity of optimizing what periods of cells we should use for regenerative medicine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：循環器内科学

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：iPS 細胞，心筋細胞，イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

再生医療は人工多能性幹細胞（iPS 細胞）の発見以降その臨床応用に向けて急速に研究が進められている。しかし、iPS 細胞の分化効率や安全性の問題から細胞移植療法の実現には課題が残っている。特に循環器領域では iPS 由来心筋細胞の表現型解析も未だ不十分であり、移植源となる再生心筋の最適化の条件（純化・精製や分化後どの時期の細胞を用いるかなど）も不明である。

2. 研究の目的

（1）ヒト iPS 由来心筋細胞の表現型を詳細

に検討し、心筋サブタイプ（作業心筋型か結節型かなど）毎の分化メカニズムを明らかにする。

（2）ヒト iPS 由来心筋細胞の分化後の成熟過程について検討し、臨床応用に向けて最適な再生心筋細胞を同定する。

3. 研究の方法

（1）山中 3 因子および 4 因子をレトロウイルスベクターを用いてヒト線維芽細胞に導入することによりヒト iPS 細胞を樹立し、**hanging drop** 法による心筋細胞への分化誘導法を確立する。さらに、ヒト iPS 由来心筋

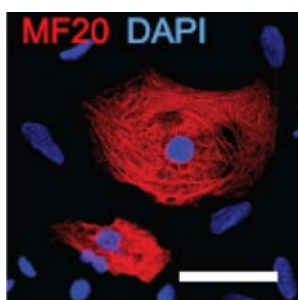
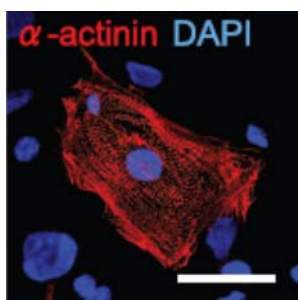
細胞が NKX2.5、GATA4、MEF2 などの心筋転写因子、ANP、BNP などの心筋マーカー遺伝子およびトロポニン、アクチン、ミオシン軽鎖/重鎖などの心筋収縮関連蛋白が発現し、形態的および遺伝子発現的にも心筋細胞であることを免疫染色および PCR 法で確認する。

(2) ヒト iPS 細胞の心筋分化過程を、分化早期 (誘導後 30 日以前)、中期 (誘導後 30 ~ 60 日)、後期 (誘導後 60 日以降) に分類し、各時期の胚様体(EB)から蛋白および mRNA を抽出する。これらのサンプルを QT-PCR 解析を行い、SCN5A、CACNA1、HCN1,2,4、KCNJ2、CACN(Ttype)の遺伝子発現の経過を検討する。

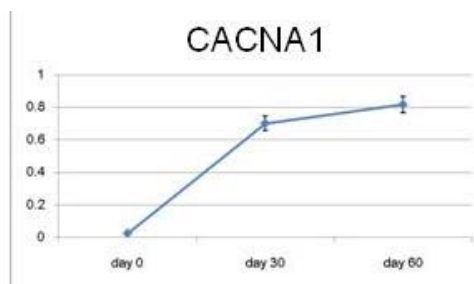
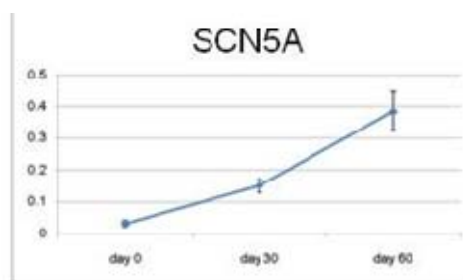
(3) 心筋分化過程における心筋サブタイプの割合を検討し、(2)で明らかとなった遺伝子発現変化と比較することによりいかなるチャンネルの発現が心筋細胞のサブタイプ分類に寄与しているかを解明する。

4. 研究成果

(1) ヒト iPS 由来心筋細胞が NKX2.5、GATA4、MEF2 などの心筋転写因子、ANP、BNP などの心筋マーカー遺伝子およびトロポニン、アクチン、ミオシン軽鎖/重鎖などの心筋収縮関連蛋白が発現し、形態的および遺伝子発現的にも心筋細胞であることを免疫染色および PCR 法で確認した。

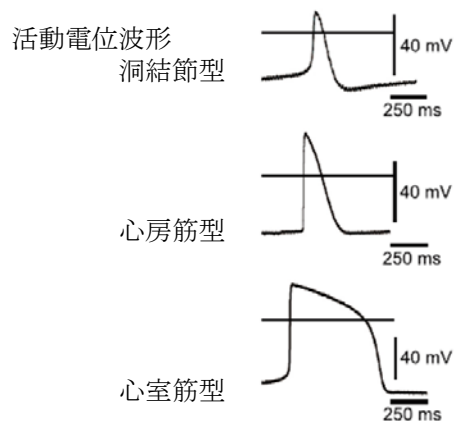


(2) 心筋イオンチャンネル(SCN5A、CACNA1、KCNQ1、KCNE1、KCNE2、KCNJ2、HCN1,2,4 など) の遺伝子発現を、QT-PCR 法で検討した。早期分化心筋細胞と後期分化心筋細胞における遺伝子発現を比較すると、SCN5A は 2.6 倍、



CACNA1C は 1.1 倍、KCNJ2 は約 10 倍増加していた。一方、HCN4 は 0.1 倍、CACNA1G は 0.3 倍と減少していた。以上より、分化後早期には洞結節型細胞に発現が多いペースメーカーチャンネル遺伝子発現が優位で、培養とともに静止膜電位が過分局側にシフトし、活動電位立ち上がりが速くなる心室筋型細胞の遺伝子パターンに変化していた。

(3) ヒト iPS 由来心筋細胞から培養早期(30日)と後期(60日)で微小電極法を用いて活動電位を記録した。早期の分化心筋細胞では、結節型が 23%、心房型が 52%、心室型が 25%であったのに対し、後期では結節型 4%、心房型 44%、心室型 52%と、培養とともに結節型が減少し心室型が増加する傾向にあり、分化心筋細胞が培養により成熟化することが示唆された。これは、早期心筋細胞でペースメーカーチャンネル遺伝子発現が優位で、後期には心室筋型チャンネル遺伝子発現が増加した、遺伝子発現パターンと一致していた。



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 12 件)

1. Tohyama S, Hattori F, Sano M, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Yamashita H, Satoh Y, Hashimoto H, Egashira T, Seki T, Muraoka N, Yamakawa H, Ohgino Y, Yuasa S, Murata M, Suematsu M, Fukuda K. Distinct metabokic flow enables large-scale purification of pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. 2013. *Cell Stem Cells*.12: 127-137.
査読あり
2. Egashira T, Yuasa S, Suzuki T, Aizawa Y, Yamakawa H, Matsuhashi T, Ohno Y, Tohyama S, Okata S, Seki T, Kuroda Y, Yae K, Hashimoto H, Tanaka T, Hattori F, Sato T, Miyoshi S, Takatsuki S, Murata M, Kurokawa J, Furukawa T, Makita N, Aiba T, Shimizu W, Horie M, Kamiya K, Kodama I, Ogawa S, Fukuda K. Disease characterization using LQTS-specific induced pluripotent stem cells. 2012 *Cardiovasc Res*. 95: 419-429.
査読あり
3. Suzuki K, Murata M, Yasuda R, Tsuruta H, Tomotsugu N, Abe T, Iwanaga S, Akaishi M, Fukuda K. Effect of lesional differences in prolapsed leaflets on clinical outcomes in patients with mitral valve prolapse. 2012 *Am J Cardiovasc Disease*. 2: 152-159.
査読あり
4. Katsumata Y, Kimura K, Sano M, Kudo M, Arai T, Ohno Y, Tamura Y, Tsuruta H, Murata M, Yozu R, Fukuda K. Frequent long-distance flyer's undersirable mileage: an organized giant thrombus stuck in PFO. 2012 *J Thromb Thrombolysis*. 33: 296-298.
査読あり
5. Nagai T, Kohsaka S, Murata M, Okuda S, Anzai T, Sato T, Fukuda K. Significance of electrocardiographic right ventricular hypertrophy in patients with pulmonary hypertension or without right ventricular dysfunction. 2011 *J Am Coll Cardiol*. 57: E149.
査読あり
6. Egashira T, Murata M, Yasuda R, Suzuki K, Tsuruta H, Akaishi M, Fukuda K. Three-dimensional echocardiography findings of biventricular thrombi complicated by cerebral embolism. 2011 *J Echocardiography*. 9: 163-164.
査読あり
7. Murata M, Morikawa T, Okuda S, Matsushita K, Iwanaga S, Murata M, Satoh T, Ogawa S, Fukuda K. Quantitative analysis of right ventricular function in patients with pulmonary hypertension using three-dimensional echocardiography and a two-dimensional summation method. 2011. *Am J Cardiol*. 107: 484-489.
査読あり
8. Shinmura K, Tamaki K, Sano M, Murata M, Yamakawa H, Fukuda K. Impact of caloric restriction on cardiac senescence: Caloric restriction ameliorates cardiac diastolic dysfunction associated with aging. 2011. *J Mol Cell Cardiol*. 50: 117-127.
査読あり
9. Yuasa S, Onizuka T, Shimoji K, Ohno Y, Kageyama T, Yoon SH, Egashira T, Seki T, Hasimoto H, Nishiyama T, Kaneda R, Murata M, Hattori F, Makino S, Sano M, Ogawa S, WJ Prall O, Harvey RP, Fukuda K. Zac1 is an essential transcription factor for cardiac morphogenesis. 2010 *Circ Res*. 106: 1083-1091.
査読あり
10. Murata M, Tohyama S, Fukuda K. The impact of recent advances in cardiovascular regenerative medicine on clinical therapeutics and drug discovery. 2010. *Pharmacology & Therapeutics* 126: 109-118.
査読あり
11. Neely GG, Kuba K, Cammarato A, Isobe K, Amann S, Zhang L, Murata M, Elmén L, Gupta V, Arora S, Sarangi R, Dan D, Fujisawa S, Usami T, Xia CP, Keene AC, Alayari KN, Yamakawa H, Elling U, Berger C, Novatchkova M, Koglgruber R, Fukuda K, Nishina H, Isobe M, Pospisilik JA, Imai Y, Pfeufer A, Hicks AA, Pramstaller PP, Subramaniam S, Kimura A, Ocorr K, Bodmer R, Penninger JM. A novel *in vivo* Drosophila RNAi screen identifies NOT3 as a

conserved regulator of heart function. 2010 *Cell* 106: 142-153.

査読あり

12. Hattori F, Chen H, Yamashita H, Tohyama S, Satoh Y, Yuasa S, Li W, Yamakawa H, Tanaka T, Onitsuka T, Shimoji K, Ohno Y, Egashira T, Kaneda R, Murata M, Hidaka K, Morisaki T, Sasaki E, Suzuki T, Sano M, Makino S, Oikawa S, Fukuda K. A non-genetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes. 2010 *Nature Methods* 7: 61-66.
査読あり

[学会発表] (計6件)

1. Murata M, Tohyama S, Kurokawa J, Egashira T, Yuasa S, Furukawa T, Fukuda K. Application of human iPS cell-technologies to arrhythmia researches. The 4th the Asia Pacific Heart Rhythm Society Annual Meeting (Symposium). September 2011. September 21-22 (Fukuoka).
2. Seki T, Yuasa S, Oda M, Egashira T, Yae K, Kusumoto D, Nakata H, Tohyama S, Hashimoto H, Kodaira M, Kuroda Y, Tanaka A, Ohkata S, Ohno Y, Murata M, Okada Y, Seimiya H, Fudaki N, Hasegawa M, Fukuda K. Human peripheral T cell derived induced pluripotent stem cells can differentiate into functional cardiomyocyte. 第75回日本循環器学会学術集会、2011年8月3-4日(横浜)
3. 鈴木智之, 村田 光繁, 山川裕之、水澤美香、遠山周吾、扇野泰行、湯浅慎介、牧野伸司、佐野元昭、神谷香一郎、福田 恵一、低分子量G蛋白質Radの抑制は、マウス心筋L型カルシウム電流を増加させることで triggered activity を引き起こす、平成22年度生理学研究所研究会「イオンチャネル・トランスポーターと心血管機能:細胞機能の分子機序とその統合的理解」、2010年11月4-5日(岡崎)
4. 久場敬司, 鈴木亨, 森田正行, 村田 光繁, 山川裕之、Neely G、Penninger J、福田恵一、磯部光章、木村彰方、今井由美子、ゲノムワイド RNAi 心不全スクリーニングに

よる心機能調節因子CCR4-NOT複合体の同定、平成22年度生理学研究所研究会「イオンチャネル・トランスポーターと心血管機能:細胞機能の分子機序とその統合的理解」、2010年11月4-5日(岡崎)

5. 遠山周吾、村田光繁、黒川洵子、Lopez-Redondo F、服部文幸、水澤美加、山川裕之、橋本寿之、江頭徹、関朋久、扇野泰行、八戸宏二郎、湯浅慎介、福田恵一、ヒトiPS由来心筋細胞の電気生理学的特性について、第25回日本心電学会学術集会2010年10月8-9日(大分)
6. 村田光繁. 心筋イオンチャネルの膜への輸送とその調節、第25回大山不整脈カンファレンス(招待講演)、2010年8月21日(名古屋)

[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]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 光繁 (MURATA MITSUSHIGE)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 30317135

(2) 研究分担者

牧野 伸司 (MAKINO SHINJI)
慶應義塾大学・医学部・特任准教授
研究者番号: 20306707

(3) 連携研究者

なし