

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：若手研究(A)

研究期間：2010～2012

課題番号：22689027

研究課題名（和文） 転写因子を用いた心筋細胞分化誘導方法の開発

研究課題名（英文） The development of cardiomyocyte induction method

研究代表者

湯浅 慎介 (YUASA SHINSUKE)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：90398628

研究成果の概要（和文）：iPS細胞は線維芽細胞にES細胞特異的転写因子を導入し樹立される多能性幹細胞である。患者特異的心筋細胞を得るにはiPS細胞を樹立・維持し分化・選別する。また心臓特異的転写因子を線維芽細胞に導入することで直接心筋細胞の分化誘導が可能であると考えられている。心筋特異的転写因子を線維芽細胞に遺伝子導入し、心筋特異的遺伝子発現が上昇することを確認した。これらにより心筋再生医療へ応用されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The direct induction of cardiomyocyte from fibroblast is highly desired for cardiac regenerative medicine. The combination of cardiac transcription factors successfully induces cardiomyocyte redirection from fibroblast. Quantitative RT-PCR analysis showed significant increased expression of cardiac specific genes. Immunostaining also revealed induced cardiomyocytes showed typical morphology of mature cardiomyocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2011年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2012年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
総計	19,300,000	5,790,000	25,090,000

研究分野：医歯薬学

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：分子心臓病態学

1. 研究開始当初の背景

iPS細胞は樹立手技の汎用性とES細胞にきわめて類似した幹細胞としての性質を有することより、再生医療への応用が期待されている。心臓疾患に関しては、末期心不全をはじめとした現代の医療技術では解決されていない致死的疾患が数多くあり、細胞移植医療・再生医療により解決できるのではないかと期待されている。また心疾患は発症したら緊急に治療を要することが多いが、iPS細胞は線維芽細胞の採取から樹立に長い時間

を要し、心筋細胞分化誘導、心筋細胞選別及び移植にも多くの時間を要する。現在までに開発された方法を用いてiPS細胞を心疾患に対して臨床応用する際には次のようになる。①患者より皮膚組織を採取し線維芽細胞より自己iPS細胞を樹立 ②心筋細胞を分化誘導 ③心筋細胞を選別 ④細胞シートをはじめとした組織工学技術により移植に適する方法を用い ⑤移植を行う。ここで最も重要な行程は心筋細胞を効率的に分化誘導することである。ヒトの心臓は巨大な臓器であ

るが、心筋細胞は終末分化後には自己増殖しない。その為に十分な成熟心筋細胞数を得る必要がある。iPS細胞の分化はES細胞の分化に類似しており、これまでのES細胞から心筋細胞の分化誘導を応用することとなる。しかしながら非常に大きいヒトの心臓に移植して機能改善が見込まれるだけの心筋細胞数を効率的に得る方法は未だ開発されていない。すなわち上記方法を用いて、すぐに臨床応用していくのは難しいと言える。そこで、新たな心筋細胞分化誘導方法を確立する必要があると我々は考えた。

2. 研究の目的

iPS細胞は線維芽細胞にES細胞特異的な転写因子を導入し樹立されるES細胞類似多能性幹細胞である。患者特異的心筋細胞を得るにはiPS細胞を樹立・維持しながら分化・選別していく。我々は、心臓特異的転写因子を線維芽細胞に導入することで、直接心筋細胞が分化誘導可能性ではないかと考えている。これまで16種類の心筋特異的転写因子をレトロウイルスにより線維芽細胞に遺伝子導入し心筋細胞分化を検討してきた。これらの遺伝子導入により様々な心筋特異的遺伝子発現が大きく上昇することを確認した。線維芽細胞から心筋細胞直接分化誘導方法を開発することで、容易かつ迅速に心筋細胞が効率に得られ心筋再生医療へ応用されることが期待される。

3. 研究の方法

線維芽細胞に遺伝子導入する方法として、iPS細胞の樹立にも汎用されているpMXsを用いたレトロウイルスを使用する。導入する遺伝子に関しては、これまでに文献報告されているものと、これまでに我々の研究により発見した新規の転写因子、転写補助因子を用いる。線維芽細胞は成獣マウスの尻尾由来線維芽細胞とマウス胎仔由来線維芽細胞を用いる。心筋細胞分化の評価方法としては定量性を求めるために、定量RT-PCR法により心筋細胞特異的遺伝子の発現を比較する。続いて心筋細胞分化した細胞評価のために心筋細胞に分化した際に蛍光を発するように遺伝子操作したマウス由来の線維芽細胞を用いる。その後、同線維芽細胞に遺伝子導入を行い蛍光を発した細胞をFACSで選別し、Genechipによる網羅的解析、再度培養し拍動の有無、移植することによりin vivoでの機能解析等を行っていく。

4. 研究成果

線維芽細胞に遺伝子導入する方法として、iPS細胞の樹立にも汎用されている強い感染

力と強い発現を有するpMXsを用いたレトロウイルスを使用する。当初、11種類の文献的に心臓で発現している転写因子及び転写補助因子をレトロウイルスベクターに組み込み、線維芽細胞へ遺伝子導入することにより心筋細胞分化を試みたが、定量的RT-PCR法にても心筋特異的遺伝子の発現上昇は低く認められたのみであった。本年度は、これらの因子に様々な因子を加えて、遺伝子導入10日目に定量的RT-PCR法にて様々な心筋特異的遺伝子の発現上昇を検討する。また、iPS細胞を樹立する際に用いる遺伝子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)を導入することにより、iPS細胞を樹立する過程で線維芽細胞の核内環境が大きく変わることが予想される。よって、これらの因子と同時に心筋特異的転写因子を導入することにより、より効果的に心筋細胞分化が進むのではないかと予想し、iPS細胞誘導因子と同時に遺伝子導入し検討する。現在、導入遺伝子を増やしており、25因子をレトロウイルスベクターにて遺伝子導入を行っている。しかしながら当初の12因子と比較して、心筋特異的遺伝子の発現には大きな変化は認めていない。

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 25 件)

1. Okata S, Yuasa S, Yamane T, Furukawa T, Fukuda K. The generation of induced pluripotent stem cells from a patient with KCNH2 G603D, without LQT2 disease associated symptom. *J Med Dent Sci*. 2013 ; 60 : 17-22. 査読有.
2. Numasawa Y, Kawamura A, Kohsaka S, Takahashi M, Endo A, Arai T, Ohno Y, Yuasa S, Maekawa Y, Fukuda K. Anatomical variations affect radial artery spasm and procedural achievement of transradial cardiac catheterization. *Heart Vessels*. 2013 Feb 21. 査読有 . <http://link.springer.com/article/10.1007/s00380-013-0324-3/fulltext.html>
3. Egashira T, Yuasa S, Fukuda K. Novel insights into disease modeling using induced pluripotent stem cells. *Biol Pharm*

- Bull.* 2013;36(2):182-8. 査読有.
4. Tohyama S, Hattori F, Sano M, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Hashimoto H, Suzuki T, Yamashita H, Satoh Y, Egashira T, Seki T, Muraoka N, Yamakawa H, Ohgino Y, Tanaka T, Yoichi M, **Yuasa S**, Murata M, Suematsu M, Fukuda K. Distinct Metabolic Flow Enables Large-Scale Purification of Mouse and Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Cell Stem Cell.* 12, 1–11, January 3, 2013. 査読有.
 5. Maekawa Y, Kawamura A, **Yuasa S**, Ohno Y, Arai T, Fukuda K. Acute coronary syndrome or apical ballooning syndrome? Heart Vessels. 2013 Jan;28(1):130-3. 査読有.
 6. Arai T, **Yuasa S**, Miyata H, Kawamura A, Maekawa Y, Ishikawa S, Noma S, Inoue S, Sato Y, Kohsaka S, Fukuda K. Incidence of periprocedural myocardial infarction and cardiac biomarker testing after percutaneous coronary intervention in Japan: results from a multicenter registry. *Heart Vessels.* 2012 Dec 29. 査読有. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00380-012-0314-x>
 7. Nishiyama T, Kaneda R, Ono T, Tohyama S, Hashimoto H, Endo J, Tsuruta H, **Yuasa S**, Ieda M, Makino S, Fukuda K. miR-142-3p is essential for hematopoiesis and affects cardiac cell fate in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Sep 7;425(4):755-61. 査読有.
 8. 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. *Cardiovasc Res.* 2012 Sep 1;95(4):419-29. 査読有.
 9. Seki T, **Yuasa S**, Fukuda K. Generation of induced pluripotent stem cells from a small amount of human peripheral blood using a combination of activated T cells and Sendai virus. *Nature Protocols.* 2012 Mar 15;7(4):718-28. 査読有.
 10. Maekawa Y, Kawamura A, **Yuasa S**, Nesto RW, Fukuda K. Direct comparison of Takotsubo cardiomyopathy between Japan and USA: 3-year follow-up study. *Intern Med.* 2012;51(3):257-62. 査読有.
 11. Onizuka T, **Yuasa S**, Kusumoto D, Shimoji K, Egashira T, Ohno Y, Kageyama T, Tanaka T, Hattori F, Fujita J, Ieda M, Kimura K, Makino S, Sano M, Kudo A, Fukuda K. Wnt2 accelerates cardiac myocyte differentiation from ES-cell derived mesodermal cells via non-canonical pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 2012 Mar;52(3):650-9. 査読有.
 12. Maekawa Y, Kawamura A, Furuta A, **Yuasa S**, Fukuda K. A case of severe aortic stenosis with severe coronary artery disease that was successfully treated by balloon aortic valvuloplasty and percutaneous coronary intervention. *Heart Vessels.* 2012 Sep;27(5):528-31. 査読有.
 13. Numasawa Y, Kawamura A, Hashimoto S, Endo A, **Yuasa S**, Maekawa Y, Kuribayashi S, Fukuda K. Successful percutaneous coil embolization of coronary-pulmonary, -carotid, and -internal mammary artery

- fistulas. *Heart Vessels*. 2012 May;27(3):331-6. 査読有.
14. Arai T, Kawamura A, Yuasa S, Maekawa Y, Fukuda K. Successful coronary intervention of chronic total occlusion of the right coronary artery by ipsilateral injection via an isolated conus artery. *Heart Vessels*. 2012 May;27(3):327-30. 査読有.
 15. Ueno K, Kawamura A, Onizuka T, Kawakami T, Nagatomo Y, Hayashida K, Yuasa S, Maekawa Y, Anzai T, Jinzaki M, Kuribayashi S, Ogawa S. Effect of preoperative evaluation by multidetector computed tomography in percutaneous coronary interventions of chronic total occlusions. *Int J Cardiol*. 2012 Apr 5;156(1):76-9. 査読有.
 16. Egashira T, Yuasa S, Fukuda K. Induced pluripotent stem cells in cardiovascular medicine. *Stem Cells Int*. 2011;2011:348960. Epub 2011 Oct 2. 査読有.
 17. Seki T, Yuasa S, Fukuda K. Derivation of induced pluripotent stem cells from human peripheral circulating T cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2011 Sep;Chapter 4:Unit4A.3. 査読有.
 18. Maekawa Y, Kawamura A, Yuasa S, Ohno Y, Arai T, Numasawa Y, Endo A, Fukuda K. Outcomes of Intravascular Ultrasound-Guided Percutaneous Coronary Intervention With Drug-Eluting Stents Versus Bare Metal Stents for Acute Coronary Syndrome in Octogenarians. *Angiology*. 2011 Nov;62(8):620-4. 査読有.
 19. Hara M, Yuasa S, Shimoji K, Onizuka T, Hayashiji N, Ohno Y, Arai T, Hattori F, Kaneda R, Kimura K, Makino S, Sano M, Fukuda K. G-CSF influences mouse skeletal muscle development and regeneration by stimulating myoblast proliferation. *J Exp Med*. 2011 Apr 11;208(4):715-27. Hara and Yuasa are equally contributed. 査読有.
 20. Tamura Y, Matsumura K, Sano M, Tabata H, Kimura K, Ieda M, Arai T, Ohno Y, Kanazawa H, Yuasa S, Kaneda R, Makino S, Nakajima K, Okano H, Fukuda K. Neural crest-derived stem cells migrate and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 Mar;31(3):582-9. 査読有.
 21. Li W, Yamashita H, Hattori F, Chen H, Tohyama S, Satoh Y, Sasaki E, Yuasa S, Makino S, Sano M, Fukuda K. Simple autogeneic feeder cell preparation for pluripotent stem cells. *Stem Cell Res*. 2011 Jan;6(1):83-9. 査読有.
 22. Zhang Y, Sano M, Shinmura K, Tamaki K, Katsumata Y, Matsuhashi T, Morizane S, Ito H, Hishiki T, Endo J, Zhou H, Yuasa S, Kaneda R, Suematsu M, Fukuda K. 4-Hydroxy-2-nonenal protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via the Nrf2-dependent pathway. *J Mol Cell Cardiol*. 2010 Oct;49(4):576-586. 査読有.
 23. Seki T, Yuasa S, Oda M, Egashira T, Yae K, Kusumoto D, Nakata H, Tohyama S, Hashimoto H, Kodaira M, Okada Y, Seimiya H, Fusaki N, Hasegawa M, Fukuda K. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell*. 2010 Jul 2;7(1):11-4. Seki and Yuasa are equally contributed. 査読有.
 24. Yuasa S, Onizuka T, Shimoji K, Ohno Y, Kageyama T, Yoon SH, Egashira T, Seki T,

- Hashimoto H, Nishiyama T, Kaneda R, Murata M, Hattori F, Makino S, Sano M, Ogawa S, Harvey RP, Fukuda K. Zc1 is an essential transcription factor for cardiac morphogenesis. *Circ Res.* 2010. Apr 2;106(6):1083-91. 査読有.
25. Shimoji K, Yuasa S, Onizuka T, Hattori F, Tanaka T, Hara M, Ohno Y, Chen H, Koshimizu U, Ogawa S, Fukuda K. G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes in vivo and in derivation from ES and iPS cells. *Cell Stem Cell.* 2010 Mar 5;6(3):227-37. Shimoji and Yuasa are equally contributed. 査読有.
- [学会発表] (計 17 件)
1. Yuasa S: iPS 細胞を用いた心臓病疾患モデルの構築と病態解明 Symposium. The 12th Congress of the Japanese Society for Regenerative Medicine. Yokohama. Mar 22, 2013.
 2. Yuasa S: The Cardiovascular Disease Modeling by using iPS cells. The Japanese Circulation Society. JCS/ISHR joint symposium. Yokohama. Mar 16, 2013.
 3. Yuasa S: The cardiovascular Disease modeling by using iPS cells. The 29th Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese section. Fukuoka. Symposium. Oct 27, 2012.
 4. Yuasa S: Disease modeling using iPS cells. The 60th annual scientific session of the Japanese college of cardiology. Kanazawa. Panel discussion. Sep 16, 2012.
 5. Yuasa S: The establishment of analysis methods and novel therapies for cardiovascular diseases syndrome using human iPS cells. The Japanese Circulation Society. Symposium. Fukuoka. Mar 17, 2012.
 6. Yuasa S: The establishment of analysis methods for cardiovascular genetic diseases using human iPS cells. Symposium. 第85回日本薬理学会年会. 京都. 2012年3月15日
 7. Yuasa S: Drug evaluation for personalized medicine by using human iPS cells. The 28th Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese Section. Symposium. Tokyo. December 2, 2011
 8. Yuasa S: Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. Kuopio Stem cell Workshop, Kuopio, Finland, September 28, 2011
 9. 湯浅慎介: 末梢血最終分化 T 細胞からの iPS 細胞樹立方法の開発、日本臨床免疫学会総会 モーニング教育講演. 東京. Sep 7, 2011
 10. Yuasa S: Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Peripheral Blood: Less Invasive and Clinically Applicable Technique. The Japanese Circulation Society. Symposium. Yokohama. August 4, 2011.会長特別企画
 11. 湯浅 慎介:iPS 細胞時代に向けた心筋再生の現状と展望. 日本動物細胞工学会 2011 年度大会. Symposium. 東京. 2011 年 7 月 22 日
 12. Yuasa S: Generation of induced pluripotent stem cells from human peripheral blood: less invasive and clinically applicable technique. The 41th Taiwan Society of Cardiology (TSOC) Annual Convention and Scientific Session. Taipei, Taiwan. May 14, 2011
 13. 湯浅慎介: G-CSF regulates skeletal muscle development and regeneration through

- myoblast-specific expression of the G-CSF receptor. Young Investigator Award. 再生医療学会、東京、2011 Mar 2nd
14. 湯浅慎介：循環器疾患再生療法開発に向けた iPS 細胞研究. 心筋生検研究会、Symposium. 東京. 2010 Nov 27.
 15. 湯浅慎介、福田恵一：循環器疾患再生療法開発に向けた iPS 細胞研究. 人工臓器学会大会、Symposium. 仙台. 2010 Nov 19.
 16. Yuasa S: G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes in vivo and in derivation from ES cells and iPS cells. World Stem Cells & Regenerative Medicine. Seoul, Korea. Oct 27, 2010
 17. Yuasa S, Nishiyama T, Prall OJ, Harvey RP, Fukuda K: Inhibition of cardiac myocyte apoptosis by Zac1, an essential transcription factor for cardiac morphogenesis. Weinstein meeting, Amsterdam, Netherland. 2010 May 20.
- [図書] (計 13 件)
1. 湯浅慎介、ヒト iPS 細胞を用いた心筋再生医療の現状と未来、2012、4月、循環器内科、1 頁 - 3 頁。
 2. 湯浅慎介、臨床応用へ向けた iPS 細胞樹立方法の開発、2012、呼吸と循環、5 頁 - 7 頁。
 3. 湯浅慎介、AHA2011学会聴講記、2012、International Review of Thrombosis (ア) 3 頁 - 7 頁。
 4. 湯浅慎介、患者特異的 iPS 細胞による疾患メカニズムの解明、Annual Review 循環器 2012年1月25日、page 49-53、中外医学社、5 頁 - 7 頁。
 5. 湯浅慎介、iPS/ES細胞研究、2011年4月21日、Medical Tribune、1 頁 - 3 頁。
 6. 湯浅慎介、福田恵一、炎症細胞が作り出すニッチと筋肉再生、実験医学増刊号、2011年、198-203.
 7. 湯浅慎介、iPS/ES細胞研究、2011年1月20日、Medical Tribune、1 頁 - 3 頁。
 8. 湯浅慎介、福田恵一、循環器疾患特異的 iPS 細胞研究の展開、2011、1月号、心臓、10-13.
 9. 湯浅慎介、ヒト末梢血からの iPS 細胞樹立方法の開発、2010、Medical View Point、1 頁 - 3 頁。
 10. 湯浅慎介、福田恵一、G-CSFを用いたES細胞、iPS細胞由来心筋前駆細胞の増殖促進、2010、細胞工学、1258-1261.
 11. 湯浅慎介、iPS/ES細胞研究、2010年10月21日、Medical Tribune、1 頁 - 3 頁。
 12. 湯浅慎介、iPS/ES細胞研究、2010年7月18日、Medical Tribune、1 頁 - 3 頁。
 13. 湯浅慎介、iPS/ES細胞研究、2010年4月15日、Medical Tribune、1 頁 - 3 頁。
6. 研究組織
(1) 研究代表者
湯浅 慎介 (YUASA SHINSUKE)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：90398628