様　式　C－19、F－19、Z－19　(共通)

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 27 年　 6 月 23 日現在

機関番号：34315
研究種目：若手研究(A)
研究期間：2011～2014
課題番号：23689041

研究課題名（和文）初期化過程で出現する心筋前駆様細胞と光イメージングを用いた新規心臓再生療法の確立

研究課題名（英文）Establishment of cardiac regeneration therapy using modified reprogramming strategy and bioluminescent imaging

研究代表者
川村　晃久（Kawamura, Teruhisa)

立命館大学・生命科学部・准教授

研究者番号：90393199

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　19,100,000円

研究成果の概要（和文）： マウス繊維芽細胞に初期化因子を発現させiPS細胞を誘導する早期で発現する表面マーカーとしてSca1とCD34が同定された。興味深いことにSca1，CD34二重陽性細胞群は、iPS細胞へ初期化されることはほとんどなく、無血清条件で増殖因子添加により10回程度まで継代可能でありスフィア形成能を維持していた。このスフィアは、接着培養により自己拍動する心筋細胞へ効率的に分化した。さらに、免疫不全マウスへの移植実験と光イメージングにより腫瘍性増殖能に乏しいことも確認された。このように、Sca1，CD34二重陽性細胞群は、安全かつ効率的な心筋再生のための新たな細胞ソースになると期待される。

研究成果の概要（英文）：Although induced pluripotent stem (iPS) cell-based cardiac regeneration therapy has been expected, safety, costs, and duration of iPS cell derivation are considered as barriers against the clinical application. To overcome these problems, we tried to modify the reprograming process, in order to create cardiac myocytes directly from fibroblasts rapidly and efficiently with few risks of tumorigenesis. Sca1+/CD34+ cells appeared in the early phase of four factor-mediated reprogramming of mouse embryonic fibroblasts. While these cells are not susceptible to iPS cell formation, they can be maintained during over 10 passages under a certain culture condition, and possess the ability to differentiate into cardiac myocytes. In addition, using bioluminescent imaging, these cells did not develop the teratoma formation after implantation into immune-deficient mice. Taken together, these cells could be a novel cell source for safe and efficient cardiac regeneration therapy.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：再生医学　幹細胞生物学　体細胞初期化

１．研究開始当初の背景

食生活の欧米化により肥満・糖尿病が急増している。その最大の合併症は冠動脈硬化による虚血性心不全で、重症化すると従来の薬物療法に抵抗性を示し予後不良である。故に、喪失した心筋細胞の再生は根本的な治療と期待され、その一刻も早い臨床応用の実現は社会的急務である。

これまで、無限の自己複製能と多分化能を持つ多能性幹細胞が注目され、これらを増殖、分化させ心筋細胞を作製し移植する方法が、申請者を含む多くの研究者により試みられてきた。特に、人工多能性幹 (iPS) 細胞は、樹立に伴う倫理的問題や免疫拒絶による移植不全を解決し、再生療法の強力なツールとして期待されている。しかし、低い樹立効率、株間の質の不均一性、移植後腫瘍形成など実用化にむけて克服すべき課題も多い。一方、iPS 細胞を用いない新たな方法として、複数の細胞特異的転写因子を繊維芽細胞に発現させて、直接的に機能的な神経細胞や心筋細胞を作成する報告がなされた。この方法では、腫瘍形成の危険性は軽減されるが、転換効率と増殖能が十分でないため、移植治療に必要な細胞数の確保は容易でない。

２．研究の目的

先述のような背景のもと、申請者は、iPS 細胞の持つ弱点を克服し、多量の心筋細胞を生み出す特定の細胞集団を初期化誘導過程の中から同定する試みを着想し、これを可能とする有用な表面マーカーを独自に見出した。本研究では、この細胞集団の特性解析を通じて誘導条件を改良し、未分化 iPS 細胞を樹立せずに十分量の安全な心筋細胞を効率的かつ俊敏に作製する。その効果と安全性の確認のため、光イメージング技術を利用して心臓内移植細胞の挙動を生体で時空間的に追跡し、次世代心臓再生療法の基盤構築を目指す。

３．研究の方法

マウスおよびヒト繊維芽細胞に初期化因子をウイルスベクターを用いて遺伝子導入する。初期化誘導過程で出現する心筋細胞誘導候補となる細胞群をセルソーターを用いて選別し研究を施行した。

(1) 細胞培養

13.5 日マウス胎児から繊維芽細胞（MEFs）を採取した。Oct4、Sox2、Klf4、cMyc の 4 因子をレトロウイルスを用いた遺伝子導入により発現させ、導入２日目から ES 細胞の培養条件にて iPS 細胞形成を誘導した。光イメージングの実験に用いた細胞は、全身にルシフェラーゼを発現する 13.5 日マウス胎児から採取した。

(2) 遺伝子導入

Package 細胞にレトロウイルス発現用のベクターを lipofection にて発現させ培養上清を採取し、ポリブレン（8ug/ml, final）と共に、目的の遺伝子に対するウイルス上清を混ぜたものを繊維芽細胞に添加した。

(3) 免疫染色

セルソーティングしてから 7 日前後に、iPS 細胞の最も特異的なマーカー遺伝子である Nanog に対する抗体を用いて ABC 法にて染色を行った。Nanog 陽性細胞で形成されるコロニーの数をカウントすることにより iPS 細胞形成効率（＝初期化効率）を評価した。誘導した心筋細胞に対しては、alpha-sarcomeric actinin などに対する抗体を用いた蛍光免疫染色により形態とマーカー蛋白質の発現を評価した。

(4) 遺伝子発現解析

iPS 細胞誘導後、各時系列毎に RNA を採取し遺伝子の発現を QPCR 法あるいは、Microarray 法により解析した。

(5) セルソーティング

Sca1(Ly6A/E)、CD34 に対する抗体をそれぞれ用いて 4 因子導入後 5 日目 に FACS Aria (BD biosciences)を用いて細胞選別を行った。

(6) 光イメージング

IVIS imaging system を用いてルシフェラーゼ陽性の移植細胞の増殖能を継時的に評価した。ルシフェリンをマウス腹腔内へ投与後、気化麻酔下にて発光を観察した。

４．研究成果

(1) 初期化誘導過程における iPS 細胞形成効率の高い細胞集団の解析

初期化誘導過程で発現が変化する種々の表面マーカーを検索した。この中から２つのマーカーSca1 と CD34 を見いだし、その組み合わせにより、初期化効率の高い群と低い群を誘導早期で予測することに成功した。誘導 5 日目に、セルソーターで細胞選別を行い培養を継続した。Nanog 陽性 iPS 細胞コロニー数により初期化効率を評価したところ、Sca1, CD34 二重陰性細胞郡が最も高く、Sca1, CD34 二重陽性細胞郡が最も低かった。Sca1, CD34 二重陰性細胞群から樹立した iPS 細胞は多分化能を示し、胚盤胞へ移植することでキメラマウスを形成した。

(2) 初期化誘導過程における iPS 細胞形成効率が低いが心筋細胞誘導能を示す細胞集団の同定

初期化誘導 5 日目に、セルソーターにより細胞を選別し培養を継続したところ、Nanog 陽性 iPS 細胞コロニー出現効率が極めて低い Sca1, CD34 二重陽性郡は、特定の培養条件下で 10 回程度まで継代可能であり心筋前駆細胞様のスフィア形成能を維持し、接着培養により自己拍動する心筋細胞へ分化することが確認された。さらに、自己拍動率や心筋前駆細胞マーカー遺伝子発現により評価したところ、Sca1, CD34 二重陽性群が最も心筋分化効率の高い前駆様細胞集団であることが判明した。

(3) **初期化誘導過程で出現する各細胞集団における腫瘍形成能の評価。**

初期化誘導5**日目に、セルソーターにより細胞を選別し、免疫不全マウスへの移植実験を行ったところ、**Sca1, CD34**二重陰性群では、高頻度に奇形腫が発症し、その腫瘍サイズも他の細胞群と比べ有意に大きいことが判明した。**Sca1, CD34**二重陽性群由来の細胞は奇形腫瘍の形成能に乏しい安全性の高い細胞集団であることが示唆された。**

(4) **光イメージングを用いた安全性の検証**

最後に、生体リアルタイムイメージングにより、移植細胞の運命を同一個体で時空間的に追跡する目的で、全身にホタル発光酵素ルシフェラーゼを発現するマウスから繊維芽細胞を採取して初期化誘導を行った。Sca1, CD34**二重陽性群由来の細胞は**Sca1, CD34**二重陰性群と比べ、腫瘍性増殖を示さないことが確認された。**

以上の結果から、iPS **細胞誘導過程で出現する、**Sca1, CD34**二重陽性細胞群は、安全かつ効率的な心筋再生のための新たな細胞ソースになると期待される。**

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）

〔雑誌論文〕（計　５件）

① Kida YS*, <u>Kawamura T</u>*, Zong W, Sogo T, Jacinto S, Shigeno A, Kushige H, Yoshihara E, Liddle C, Ecker JR, Yu RT, Atkins AR, Downes M, Evans RM. ERRs Mediate a Metabolic Switch Required for Somatic Cell Reprogramming to Pluripotency., (*Equal co-first author) ***Cell Stem Cell.*** 2015;16:547-555. doi: 10.1016/j.stem.2015.03.001. (**査読あり**)

② Koga M, Matsuda M, <u>Kawamura T</u>, Sogo T, Shigeno A, Nishida E, Ebisuya M., Foxd1 is a mediator and indicator of the cell reprogramming process., ***Nature Commun***. 2014;5:3197. doi: 10.1038/ncomms4197. (査読あり)

③ <u>川村晃久</u>**、重野麻子、十河孝浩**, iPS **細胞を用いた心血管創薬スクリーニング**, J-ISCP **会誌心血管薬物療法** 2014**年**2**巻**1**号**、pp71-74. URL http://www.j-iscp.com/pdf/j-iscp02.pdf (**査読なし**)

④ Nishi H, Ono K, Horie T, Nagao K, Kinoshita M, Kuwabara Y, Watanabe S, Takaya T, Tamaki Y, Takanabe-Mori R, Wada H, Hasegawa K, Iwanaga Y, <u>Kawamura T</u>, Kita T, Kimura T. MicroRNA-27a regulates beta cardiac myosin heavy chain gene expression by targeting thyroid hormone receptor beta1 in neonatal rat ventricular myocytes. ***Mol Cell Biol***. 2011;31:744-755. doi: 10.1128/MCB.00581-10. (**査読あり**)

⑤ Kaichi S, Takaya T, Morimoto T, Sunagawa Y, <u>Kawamura T</u>, Ono K, Shimatsu A, Baba S, Heike T, Nakahata T, Hasegawa K. Cyclin-dependent kinase 9 forms a complex with GATA4 and is involved in the differentiation of mouse ES cells into cardiomyocytes. ***J Cell Physiol.*** 2011;226:248-254. doi: 10.1002/jcp.22336. (**査読あり**)

〔学会発表〕（計　６件）

① <u>川村晃久</u>, **初期化技術による安全かつ効率的な心筋細胞作製方法**, **イノベーション・ジャパン** 2014**～大学見本市～**, 2014 **年** 9 **月** 11**～**12 **日**, **東京ビッグサイト（東京都）**

② Shigeno A, Sogo T, Baba A, Ueyama T, Hasegawa K, Nakahata T, <u>Kawamura T</u>., Identification of the novel cardiac progenitor-like cell population by modifying the process of somatic cell reprogramming., **第** 36 **回日本分子生物学会年会、**2013 **年** 12 **月** 11 **日、神戸国際会議場（兵庫県）**

③ <u>川村晃久</u>, **初期化誘導技術を応用した次世代心筋再生治療薬の開発**, **日本薬学会第** 133 **年会**, 2013 **年** 3 **月** 29 **日**, **パシフィコ横浜（神奈川県）**

④ **重野麻子、十河孝浩、加藤　格、長谷川浩二、中畑龍俊、**<u>川村晃久</u>, **表面マーカーによる初期化成功・不成功群の解析**, **第** 12 **回日本再生医療学会**, 2013 **年** 3 **月** 22 **日**, **パシフィコ横浜（神奈川県）**

⑤ <u>Kawamura T</u>. Novel cell population contributing to successful somatic cell reprogramming from mouse embryonic fibroblasts., CiRA International Symposium 2013, 2013 **年** 3 **月** 11 **日**, **京都大学（京都府）**

⑥ <u>川村晃久</u>**、十河孝浩、尾野　亘、加藤　格、長谷川浩二、中畑龍俊**, **初期化誘導過程で出現する心筋前駆様細胞を用いた安全かつ効率的な心筋再生療法の確立**, **第** 33 **回日本炎症・再生医学会**, 2012 **年** 7 **月** 5 **日**, **ホテル日航福岡（福岡県）**

〔図書〕（計　２件）

① <u>川村晃久</u>**、木田泰之　「脂肪幹細胞と** iPS **細胞」** **医学のあゆみ**（2012**年**242**巻**4**号**、pp337-342） **医歯薬出版**

② <u>川村晃久</u>**、十河孝浩　「老化と**iPS**細胞」アンチ・エイジング医学—日本抗加齢医学会**

雑誌（2011年、第7巻、第1号、pp76-81）メディカルレビュー社

〔産業財産権〕
○出願状況（計１件）
人工多能性幹細胞、心筋細胞又はその前駆細胞の製造方法
発明者：川村晃久
権利者：国立大学法人京都大学
種類：特許
番号：PCT/JP2013/085260
出願年月日：2013 年 12 月 28 日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
研究室ホームページ～川村研究室へようこそ～；http://kawamura-lab.jp/index.html

６．研究組織
(1)研究代表者
川村　晃久（KAWAMURA, Teruhisa）
立命館大学・生命科学部・准教授
研究者番号：90393199