

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）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(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790877

研究課題名（和文） 誘導多能性幹細胞由来心筋細胞の機能解析および質の検討

研究課題名（英文） Functional and qualitative analysis of cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells

研究代表者

大野 洋平 (OHNO YOHEI)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：80383884

研究成果の概要（和文）：我々は様々な iPS 細胞ラインより心筋細胞を分化誘導し、iPS 細胞ラインにより心筋分化効率が異なることを解析した。導入遺伝子さらにそれらを純化した(未分化細胞や非心筋細胞を除去)後、iPS 細胞樹立に用いた導入遺伝子の発現を iPS 細胞ライン毎に調べたところ、iPS 細胞ラインにより導入遺伝子の発現レベルが異なっており、導入遺伝子の発現が高いままのものは心筋分化効率も悪く、心筋分化に対して抵抗性を示していることが確認された。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the difference of cardiomyocyte (CM) differentiation derived from mouse iPS cells. High-quality iPS cells which highly expressed stem cell markers without transgene expression showed better CM differentiation properties in terms of time point and efficiency. Low-quality iPS cells which also expressed stem cell markers with residual transgene expression hardly ever differentiated into CMs. Purified low-quality iPS cell-derived CMs retain residual transgene expression which may have contributed to lower incidence of beating colonies. However, interestingly, despite its stem cell quality, the iPS cell-derived CM showed normal characteristics. Electrophysiological study demonstrated that iPS cell-derived CMs have sinus node-like and fetal ventricular type action potentials. Moreover, pharmacological studies demonstrated that iPS cell-derived CMs have normal chronotropic responses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：iPS 細胞、iPS 細胞由来心筋細胞、iPS 細胞由来心筋の分化誘導効率

1. 研究開始当初の背景

ES 細胞とほぼ同等の能力を有する iPS 細胞の

登場により、患者由来の細胞移植療法が現実的な目標となってきた。患者特異的 iPS

細胞由来心筋の再生医療の実現に向けて、iPS細胞由来心筋の特性、安全性を確認する必要がある。

2. 研究の目的

我々は ES 細胞を安定して効率よく心筋細胞へ分化させる誘導方法を確立しており、本研究では、その手法を応用し、様々な iPS 細胞ラインの多能性幹細胞としての生物学的性質の違い、各細胞ラインの心筋細胞への分化効率の違いとその要因を検討し、iPS 細胞由来心筋細胞が細胞移植源として適しているかを「安全性」と「質」という二つの側面から評価することを目的としている。各 iPS 細胞ラインの未分化マーカーの発現量の違いを RT-PCR で確認、心筋細胞へ分化するまで経時的に未分化マーカー・中胚葉・心筋構造蛋白・転写因子などを QT-PCR で確認する。また、各 iPS 細胞ライン毎に電気生理学的解析を行い、作業心筋(心房心室筋)、特殊心筋(刺激伝道系)の割合をパッチクランプ法にて解析し、薬剤に対する反応も確認する。

3. 研究の方法

- (1) iPS 細胞をフィーダー細胞(MEF)上で培養し、以前から知られている胚性幹細胞から心筋細胞への効率的分化誘導方法として知られている Hanging drop 法による心筋細胞分化誘導効率を検討する。
- (2) iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導および効率化が安定した後、分化誘導後の心筋細胞の表現系の解析を行う。具体的には、RT-PCR、免疫染色にて各種遺伝子発現を確認する。
- (3) さらに、iPS 細胞由来の心筋細胞の電気生理学的特性を検討するため、パッチクランプ法を用いて活動電位記録を行い、各

種薬剤に対する反応を確認する。

4. 研究成果

- (1) iPS細胞を用いてhanging drop法による心筋細胞分化誘導効率を検討した。iPS細胞として、第一世代マウスiPS細胞(Fbx-iPS細胞)および第二世代マウスiPS細胞(Nanog-iPS細胞)を用いた結果、Nanog-iPS細胞はFbx-iPS細胞に比べて心筋への分化がより早く、より効率がよいことが判明した(図1)。さらにNanog-iPS細胞間においても心筋への分化誘導効率には差が認められた。Nanog-iPS細胞ラインのうち最も心筋分化誘導効率が優れたものはES細胞とほぼ同等であった。すなわち、今後我々がiPS細胞を移植治療などへの応用を目指した場合、各iPS細胞毎に心筋への分化誘導効率を確認し、良質な細胞ラインを選択する必要があることが示唆された。

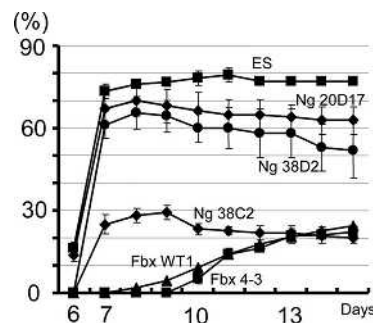


図1: 各 iPS 細胞ライン別の心筋細胞分化効率
ES: 胚性幹細胞
Ng: Ng-iPS 細胞の 3 ライン
Fbx: Fbx-iPS 細胞の 2 ライン

- (2) iPS細胞由来心筋細胞の機能解析を行った。免疫染色ではFbx-iPS、Nanog-iPS、ES細胞由来心筋細胞を比較したが、いずれも心筋特異的蛋白である α -actinin、MHC、ANPおよび心筋特異的転写因子であるNkx2.5、

GATA4などの発現が確認された。ただし、QT-PCRにおいて各種遺伝子の発現パターンを確認したところ、Nanog-iPSおよびES細胞由来心筋はほぼ同様の遺伝子発現パターンを示したが、Fbx-iPS細胞由来心筋は遺伝子発現が弱く、かつ発現のピークに至るまでの時間が遅かった(図2)。

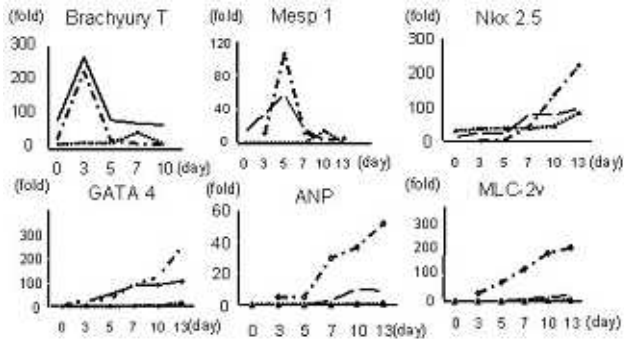


図2：各iPS細胞ライン毎の心筋細胞分化効率の違い
 - - - - - ES細胞
 ——— NgiPS細胞
 FbxiPS細胞

(3) iPS細胞由来心筋細胞の電気生理学的特性を検討するため、パッチクランプ法を用いて活動電位記録を行った。ES細胞由来心筋細胞と同様に、ペースメーカー様、心房筋様、心室筋様の活動電位が記録された。また、薬剤(イソプロテレノール、ベラパミル)に対する反応も記録された(図3)。

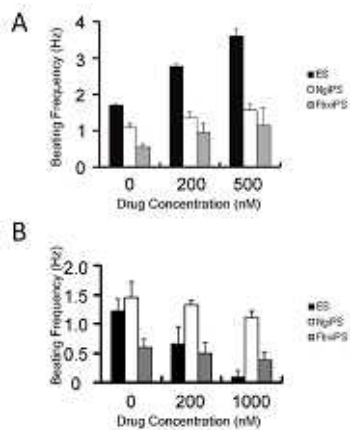


図3：各iPS細胞ライン由来心筋細胞の薬剤反応
 A: イソプロテレノール
 B: ベラパミル

(4) iPS細胞由来心筋細胞を純化した後、iPS細胞作成時に使用された4つの外来遺伝子の発現レベルを比較したところ、Nanog-iPS細胞由来心筋細胞に比べ、Fbx-iPS細胞由来心筋細胞の方が外来遺伝子の発現が高く、心筋細胞への分化抵抗性の一因と考えられた(図4)。

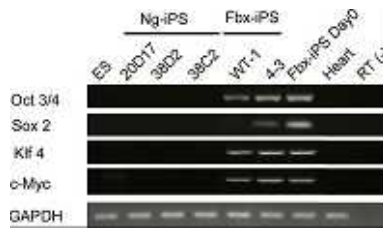


図4：純化したiPS由来心筋における導入遺伝子(4因子)の発現

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0件)

[学会発表](計1件)

2012年3月24-27日 American College of Cardiology 61st Annual Scientific Session (シカゴ、アメリカ) 発表者 大野洋平

Residual transgene expression of Yamanaka factors determine quality and differentiation efficiency of cardiomyocytes derived from mouse induced pluripotent stem cell lines

[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 特になし

6．研究組織

(1)研究代表者

大野 洋平（OHNO YOHEI）

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：80383884