

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 30 日現在

機関番号：84503

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23791209

研究課題名(和文) ヒト心筋分化誘導因子の同定 - 再生医療との複合戦略の創成 -

研究課題名(英文) Technical development for the identification of cardiomyocyte differentiation-promoting factors

研究代表者

草川 森士 (Kusakawa, Shinji)

公益財団法人先端医療振興財団・細胞療法研究開発センター・研究員

研究者番号：80462802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、効率よく多量の分化心筋細胞を獲得するための技術開発を行った。未分化細胞特異的に蛍光を発現するiPS細胞を作製した。この細胞を用いることで、分化心筋細胞の純度を定性的、定量的に評価することができる。また、ヒト体細胞の増殖は阻害せず、未分化ヒトiPS細胞特異的に強い増殖抑制作用を示す薬剤Aを選出した。この薬剤を用いることで、iPS由来の分化心筋細胞に混在する残存未分化細胞の除去が可能となり、純度の高い心筋細胞の製造が可能となる。

研究成果の概要(英文)：The efficient technology for cardiomyocyte differentiation method from human induced pluripotent stem (iPS) cells was developed in the present research. Firstly, transgenic iPS cells, which showed the specific expression of fluorescent protein in their undifferentiated state, were generated. This enables to conduct qualitative and/or quantitative analysis of the extent of differentiation of human pluripotent stem cells. Secondly, an existing drug was identified to kill undifferentiated iPS cells, but not to avoid the viability of differentiated cells. By using this drug, the establishment of purification method of cardiomyocyte from human iPS cell-derived differentiated cell clusters is prospective. Combined application of these results might provide an approach to identify novel factors, which promote cardiomyocyte differentiation.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：iPS細胞 心筋細胞 残存未分化細胞

1. 研究開始当初の背景

これまでに細胞移植に用いられる細胞について、様々な検討がなされてきたが、十分な治療効果の期待できるものはなかった。例えば、「ES 細胞は容易に心筋細胞に分化するが、免疫的拒絶や腫瘍形成の問題がある」「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」「骨髄単核球細胞は心筋細胞に分化する効率が低い」また、「遺伝子導入により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するが、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」といったものである。

これらの検討を踏まえ、多能性幹細胞、体性幹細胞等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。さらに、胚性幹細胞、体性幹細胞を心筋細胞に分化誘導する因子に加え、血管新生を促進する因子を同定することで、心筋細胞及び血管分化誘導療法の確立が可能であると考えた。また、心筋に対する細胞移植治療において、治療の有効性や安全性に大きく影響しうる問題として、心筋細胞の品質が考えられる。移植に用いる分化心筋細胞の品質を確保するためには、分化誘導の効率化に加え、純度の高い心筋細胞を作出するための精製技術等の開発も重要となってくる。

そこで本研究では、多能性幹細胞や体性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同定すること、また、効率よく多量の分化心筋細胞を獲得する方法の確立を目指す。

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医療が注目されている。現在、骨髄細胞等を用いた細胞移植がすでに臨床応用されているが、十分な数の心筋細胞および血管を再生するには至っておらず、その治療効果は満足いくものではない。細胞移植治療では、移植した細胞が生着し、心筋細胞、血管細胞そのものとして機能すること、もしくは、生着した細胞がサイトカイン等を分泌し、周辺組織の再生、機能回復を促すような作用を治療効果として期待している。分化心筋細胞を移植することによる心筋再生医療において、その治療効果を最大限に引き出すためには、移植細胞の純度、すなわち、移植する細胞がどれだけ心筋細胞に分化した状態であるかが

重要なポイントと考えられる。そこで、本研究では、多能性幹細胞や体性幹細胞から純度の高い心筋細胞を効率的に生産するための手法の確立を目的とし、分化誘導の効率化、分化細胞の精製法といった技術開発を行った。

3. 研究の方法

(1) iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導は、Lian らの方法 (PNAS 2012) を参考にし、多少の改良を施したプロトコルを検討した。培地 mTeSR で培養した iPS 細胞 (253G1) をマトリゲルでコートした培養容器に 50000 個/cm² の密度で播種し、3-4 日間培養でコンフルエントになるまで増殖させた。コンフルエントになった細胞は、12 μ M CHIR99021 (GSK3 阻害剤)、B27-insulin を含む RPMI1640 培地に置き換えられ、24 時間培養された後、RPMI1640/B27-insulin 培地に置き換えられた。さらにその 48 時間後に 5 μ M IWP4 (Wnt 阻害剤) を含む RPMI1640/B27-insulin 培地に置き換えられ、48 時間培養された後、再び RPMI1640/B27-insulin 培地に置き換えられた。その 48 時間後に、インスリンを含まない RPMI1640/B27 培地に置き換えられ、以後培養を続け、細胞分化の観察を行った。

(2) 未分化細胞特異的に蛍光蛋白を発現するヒト iPS 細胞の作成

分化細胞中に残存する未分化細胞の評価は、分化マーカー遺伝子の発現を定量 PCR 法や免疫染色法を用いて確認することができる。しかしながら、心筋細胞への分化効率を高めるような手法や、分化細胞の精製法の開発を進めていく上で、細胞の分化状態 (未分化細胞の残存状況) をより簡便に評価する方法が確立できれば有用なものとなるかもしれない。そこで、未分化細胞に特異的に蛍光蛋白を発現する iPS 細胞を作成し、蛍光蛋白の発現を指標とした細胞分化の評価が可能であるか検討することとした。

プラスミドベクター、ウイルスペクターの作成

Hotta らの報告 (Nature Methods 2009) で用いられていた、ES 細胞において高発現している Early Transposon (ETn) 由来の強力な LTR プロモーターと代表的な未分化マーカー遺伝子である Sox2 のエンハンサー領域に存在する Oct4 と Sox2 の結合モチーフを 4 量化して連結したものをプロモーター (EOS-S4)

とし、緑色蛍光蛋白 (mClover) の発現を誘導するようなコンストラクトを、人工遺伝子合成および PCR を利用して作成し、プラスミドベクター (エピソーマル型)、レンチウイルスベクターにサブクローニングした。

レンチウイルスの作成

Lenti-X HTX Packaging System を利用し、293T 細胞にベクターをパッケージングし、48 時間培養を続け、ウイルス産生を促した。回収した培養上清は、PEG-it Virus Precipitation Solution を用い、遠心を行って濃縮した。

ヒト iPS 細胞への遺伝子導入

プラスミドベクターの導入は、Fugene HD または Lipofectamine3000 を用い、細胞が培養容器 (35mm ディッシュ) に張り付いている状態に導入する方法と、細胞懸濁液 (約 1×10^6 個の細胞を含む) の状態で導入して播種する方法 (reverse transfection 法) を検討した。

レンチウイルスは、細胞が培養容器 (48 ウェルプレートの 1 ウェル) に張り付いている状態に導入する方法と、細胞懸濁液 (約 1×10^6 個の細胞を含む) の状態で導入して播種する方法 (reverse transfection 法) を検討した。尚、ウイルス感染時は 培地にポリブレンを $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で添加した。

(3) 多能性幹細胞特異的に毒性を示す薬剤のスクリーニング

iPS 細胞や ES 細胞といった多能性幹細胞から心筋細胞を作成し移植細胞として用いる場合、その分化細胞の品質において最大の懸念事項となるのが、移植細胞中の造腫瘍性を持つ未分化細胞の混在の可能性である。分化心筋細胞中に混在する未分化細胞を選択的に除去することで、心筋細胞の純度を高めることを想定し、未分化多能性幹細胞を特異的に除去する方法として薬剤の利用を考案した。薬剤をスクリーニングにあたり、催奇形性作用等の発生毒性作用を持つ薬剤を候補薬として検討することとした。

これまでに、マウス ES 細胞を用いた薬剤の発生毒性評価法 (Embryonic Stem cell Test, EST 法) が確立されている。EST 法は、薬剤に対する感受性を ES 細胞と体細胞で比較する試験で成り立っている。代表的な催奇形性を持つ薬剤のうち、EST 法においても顕著な発生毒性作用を示していた抗精神病薬である薬剤 A を用い、ヒト初代培養系体細胞 (繊維芽細胞、心筋細胞)、ヒト人工多能性幹細胞

(iPS 細胞: 201B7、253G1 株)、ヒトテラトカルシノーマ細胞株 (PA-1)、ヒト間葉系幹細胞に対する影響を検討した。

細胞毒性試験

繊維芽細胞、心筋細胞、PA-1、ヒト間葉系幹細胞は、48 ウェルプレートの 1 ウェル辺りの細胞数が 5000 個となるように播種し、ヒト iPS 細胞は 1 ウェル辺りの細胞数が 10000 個となるように播種した。尚、ヒト iPS 細胞の播種に際しては、あらかじめ各ウェルを laminin-521 でコーティングしたものをを用いた。薬剤 A は、細胞播種時に各種濃度 (0、0.03、0.1、0.3、1、3、10mM) で培地に添加し、その後の培地交換と薬剤の添加は、播種から 48、72、96 時間後に行った。薬剤添加群は各濃度 6 ウェルずつとし、さらに培地のみ添加したブランクウェルを 6 ウェル設けた。5 日目に Cell Counting Kit8 を用い、細胞のミトコンドリア内脱水素酵素により生成されたフォルマザンの呈色を 450 nm の吸光度として定量し、細胞増殖を評価した。

各群の各吸光度の値からブランクウェルの吸光度の平均値を差し引いたものをデータとして、薬剤非添加条件の吸光度を 1 としたときの薬物添加時の吸光度の割合の平均値をプロットした。

4. 研究成果

(1) iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導

分化誘導開始から約 8-9 日で、拍動している細胞集団を観察することが出来た。細胞密度の 7-8 割で拍動が認められるため、かなり高効率に心筋細胞へ分化したと思われる。詳細な分化効率に関しては、今後、フローサイトメトリーおよび定量 PCR 法を用い TNNT2 などの心筋マーカー遺伝子の発現解析をすることによって評価していく予定である。また、この分化誘導法を用い、iPS 細胞から分化した心筋細胞における未分化細胞の残存状況もプロファイルしておき、未分化特異的に毒性を示す薬剤の効果を検討する際に利用する。そのため、未分化マーカー遺伝子 (Oct4 や Lin28) の発現解析も進めていく予定である。

(2) 未分化細胞特異的に蛍光蛋白を発現する iPS 細胞の作成

ヒト多能性幹細胞への遺伝子導入効率は著しく低いことに加え、さらに単一細胞での培養が困難であることから、導入した遺伝子を安定的に発現する細胞のクローニングも困難を極めることが予想された。本研究では、まず、エピソーマルベクターを用い、Fugene HD および Lipofectamine3000 を用いた遺伝子

導入を検討した。細胞が培養容器に張り付いている状態に導入した場合は、蛍光発現は全く観察されなかった。一方、reverse transfection 法では、どちらの試薬を用いた場合でも、蛍光顕微鏡下の観察において未分化細胞での mClover の発現は若干認められたが、導入効率は 1%にも満たなかった。導入遺伝子は薬剤耐性遺伝子 (puromycin) も含んでいたため、導入 48 時間後から、puromycin 1 μ g/ml を培地に添加し培養を行った。しかしながら、やはり導入効率が低いため、薬剤耐性のクローンを得ることはできなかった。

次に、遺伝子の導入効率、発現効率が高まることを期待し、レンチウイルスでの導入を検討した。レンチウイルスは、細胞が培養容器 (48 ウェルプレートの 1 ウェル) に張り付いている状態で導入した場合は、約 1%の細胞で弱い蛍光の発現が観察された。細胞懸濁液の状態に導入した場合は、細胞毒性が強く、ウイルスを添加して播種 24 時間後でほとんどの細胞が浮いてしまっていた。そこで、ウイルスを添加した細胞懸濁液の状態に、約 4 時間インキュベートした後に細胞を洗って播種することを試みたところ、次の日の細胞の生着率は高く、さらに遺伝子導入効率も 10%ほど高かった。他の方法、条件と比べても蛍光の発現の強さは比較的高かった。現在、薬剤耐性クローンの獲得を目指し puromycin を添加した培養を続けている。

しかしながら、現時点での蛍光の発現は決して強いものではなく、フォローサイトメーターを用いた選別や、解析は困難であるかもしれない。遺伝子改変 iPS 細胞を樹立するためには、さらに導入効率、発現効率を高める必要がある。そこで、プロモーターの改変 (4 量体部分を 8 量体に)、高力価のウイルス作成なども検討すべく準備を進めている。また、遺伝子のノックインも検討する予定である。

(3) 薬剤 A の各細胞の増殖への影響

各群の各吸光度の値からブランクウェルの吸光度の平均値を差し引いたものをデータとして取得し、薬剤非添加条件の吸光度を 1 としたときの薬物添加時の吸光度の割合の平均値をプロットしたものを図 1 に示す。

繊維芽細胞に対しては、3mM の添加で約 20%の増殖抑制作用が認められ、10mM では約 70%の抑制作用が認められた。心筋細胞に対しては、1mM の添加で約 20%の増殖抑制作用が認められ、10mM ではほとんどの細胞の増殖が抑えられていた。しかしながら、これらの体細胞に対しての薬剤 A の影響は、1-3mM の添加

では、細胞の形態変化も特に観察されなかったことから、増殖抑制作用はマイルドなものといえる。この増殖抑制作用のメカニズムが、細胞周期等に影響する増殖停止作用によるものか、もしくは細胞死を誘導するような毒性作用によるものなのかを今後検討していく予定である。

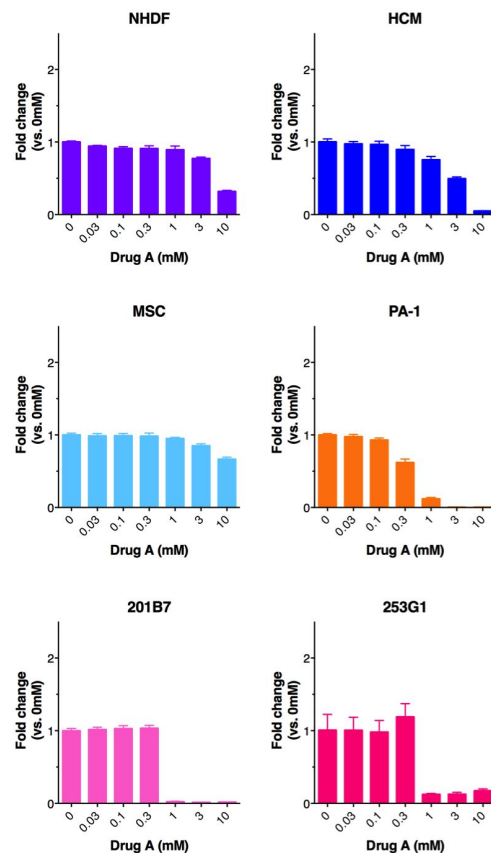


図1 各細胞の増殖に対する薬剤Aの影響

間葉系幹細胞に対しては 10mM という高濃度群においても、約 30%の増殖抑制作用しか示さなかったため、薬剤 A による細胞増殖への影響はほとんど受けないことが示された。

一方、PA-1、201B7、253G1 では、薬剤 A による増殖抑制作用が体細胞等と比較して顕著に認められた。201B7 は、培養 3 日目の時点で、1mM の添加でほとんどの細胞が死滅していた。PA-1、253G1 も 5 日目ではほとんどの細胞が死滅していた。PA-1 は 0.3mM から影響が認められ始めていたが、iPS 細胞では増殖への影響は認められなかった。体細胞と比べても増殖抑制作用を示す濃度域は狭いことが示唆される結果であった。もう少し濃度を振った検討に加え、増殖抑制作用のメカニズムについても今後検討していく予定である。

これらの結果から、薬剤 A に対する感受性が体細胞と iPS 細胞、テラトカルシノーマ細胞間で大きく異なることが分かった。薬剤 A

を上手く利用することで、iPS 細胞から分化させた細胞中に混在する未分化細胞を除去し、分化細胞の精製が期待できる。今後、薬剤の濃度、作用時間を調整し、分化細胞への影響を極力抑え、未分化細胞への特異性をさらに高めるような条件の最適化を行っていく。

また、薬剤Aに限らず、同じく催奇形性作用等の発生毒性作用を持つ薬剤についても同様の効果が得られるかを今後検討していく予定である。

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 0件)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

草川 森士(KUSAKAWA, Shinji)

公益財団法人先端医療振興財団・細胞療法

開発センター・研究員

研究者番号: 80462802

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: