

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390327

研究課題名(和文) 多能性幹細胞由来心筋シートによる心機能改善機序の解明および心不全治療創薬への応用

研究課題名(英文) Screening and discovery of drug for severe heart failure with cardiac tissue sheet technology.

研究代表者

坂田 隆造 (Sakata, Ryuzo)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20325781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：ラット心筋梗塞モデルにおけるマウスES細胞由来心臓組織シート移植治療の系を用いて、治療メカニズムを検討した。ヌードラットを治療群と非治療群の2群に分類、マウスES細胞由来心臓組織シートを移植した。移植したシート・移植されたラットの心臓をリアルタイムqPCRやDNAマイクロアレイにて解析し、複数の治療効果を持つ候補遺伝子を探索的に調べた。さらに候補として同定されたものの一つであるb-FGFのラット慢性期心筋梗塞モデルにおける徐放投与実験を行ったが、血管新生・心機能改善効果を認めた。本研究では心不全治療創薬の候補の効果を示すとともに、心不全治療創薬のスクリーニングを確立することができた。

研究成果の概要(英文)：We have conducted a transplantation study in a rat myocardial infarction model using the cardiac tissue sheets bioengineered with mouse ES cells-derived defined cardiac cell populations with cardiomyocytes, endothelial cells, and mural cells. Male nude rats were treated with sheet transplantation (treatment group) or sham operation. We analyzed the sheets or recipient heart with real-time qPCR and DNA micro array. These results suggested that b-FGF and other factors are potential treatment drugs. We administrated b-FGF with slow release system to a rat chronic MI model, and found that slow release b-FGF significantly improved cardiac function. Herein, we were able to establish the screening system, and find candidate drugs for heart failure treatment.

研究分野：心臓再生医療

キーワード：再生医療 細胞移植 ヒトiPS細胞

1. 研究開始当初の背景

急性心筋梗塞に代表される虚血性心疾患は、本邦を含む先進諸国では主要死因のひとつであり、我が国においてはこれに費やされる年間医療費は国民医療費の第一位を占めている。内科的治療や、外科的治療の進歩によって多くの心臓死が回避されるようになってきたが、これら治療の進歩に伴い、より重症の心不全患者数の増加が見られるようになってきた。

これに対して、国内外において近年、胚性幹細胞や誘導多能性幹細胞等を用いた心臓再生医療研究が行われている。しかしながら、各種幹細胞移植の臨床応用に向けての問題点として1) 移植細胞の生着率の低さ、2) 宿主細胞との機能的統合性不良、3) 非自己細胞に対する免疫反応といった点が上げられる。

一方、最近になり、従来は自己再生修復能を欠いていると考えられてきた心臓にも内在性の体性幹細胞である心筋幹細胞の存在が認められるようになってきており、心筋細胞への分化・成熟により障害心筋の再生修復が期待されるようになってきた。内在性心筋幹細胞(心外膜由来細胞)の利点は1) 元々自己組織中に存在していることから、免疫による拒絶反応がない、2) 同じ理由から倫理的問題点がない、3) 移植に伴う内科的(経カテーテル的)あるいは外科的侵襲とは無縁である、といった点が上げられる。

最近、我々はマウス胚性幹細胞由来の心臓組織シートの作成に成功し、ラット心筋梗塞モデルにこれを移植し、心機能改善効果を得た。しかしながら、移植後摘出組織標本の検討では、移植細胞の生着率は低く、これ自身による機能的改善効果は小さかった。ここでの心機能改善効果は、移植細胞の生着による作業心筋増加によるものではなく、心外膜側に貼付された心臓組織シートから、パラクライン因子等が分泌されることにより、心外膜由来細胞を動員し、これを心筋細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋、繊維芽細胞へ分化・増殖させることによりもたらされた可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では心筋細胞の前駆細胞とされる内在性心筋幹細胞に着目し、再生能力を高める因子や経路を解明し、再生医療への応用を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 心臓組織シート移植における、治療効果メカニズムの網羅的解析(内在性心筋幹細胞の心臓再生能力を高める因子や経路の解明)

ラット心筋梗塞モデルに対する、マウス ES 由来心臓組織シート移植治療の系を用いて、これを検討する。

ヌードラット(F344/NJcl-rnu/rnu)を治療

(シート移植)群と非治療(sham手術)群の2群に分類。

エーテル麻酔、挿管し人工呼吸器に装着。1.5%フォーレンで維持。

右側臥位に体位を変え左開胸。

左冠動脈前下行枝を同定し、6-0ポリプロピレン糸にてこれを結紮、心筋梗塞を作成。

心臓超音波検査にて左室駆出率の低下、左室前壁の菲薄化、梗塞領域を確認。心筋梗塞が作成できていないものは、ここで除外。

心筋梗塞作成7日後に再び開胸し、マウスES由来心臓組織シートを移植。またはsham手術を行う。

移植後心臓組織を採取し、ホモジナイズした後、RNAを抽出しDNAマイクロアレイを用いた網羅的解析により、候補遺伝子群のスクリーニングを行う。

次に上で得られた候補遺伝子群から、より治療効果の高い可能性のあるものに関して、心臓組織標本における遺伝子発現をリアルタイムqPCRおよびDNAマイクロアレイにより検討する。

2) 上記1)のラット心筋梗塞モデルにおける治療効果の検討

ラット心筋梗塞モデルに実験1)で得られた候補因子を薬剤徐放可能なゼラチンハイドロゲルとともに移植を行う。

ヌードラット(F344/NJcl-rnu/rnu)を治療(因子移植群)群と非治療(sham手術)群の2群に分類。

エーテル麻酔、挿管し人工呼吸器に装着。1.5%フォーレンで維持。

右側臥位に体位を変え左開胸。

左冠動脈前下行枝を同定し、6-0ポリプロピレン糸にてこれを結紮、心筋梗塞を作成。

心臓超音波検査にて左室駆出率の低下、左室前壁の菲薄化、梗塞領域を確認。心筋梗塞が作成できていないものは、ここで除外。

心筋梗塞作成28日後に再び開胸し、候補因子添加ゼラチンハイドロゲルを移植、またはsham手術を行う。

移植2週間後、4週間後に超音波検査にて心機能を測定する。4週間後に心臓組織標本を作製し、心筋梗塞の範囲や血管新生について測定する。

4. 研究成果

ラット心筋梗塞モデルに対する、マウスES由来心臓組織シート移植治療の系を用いて、治療メカニズムを検討した。ヌードラットを治療(シート移植)群と非治療(sham手術)群の2群に分類、マウスES由来心臓組織シートを移植、またはsham手術を行った。移植後2日目に心臓組織を採取し、リアルタイムqPCRを施行した(図1)。続いて、DNAマイクロアレイを用いた網羅的解析により、候

補遺伝子群のスクリーニングを行い、複数の候補遺伝子を得た。(図2)

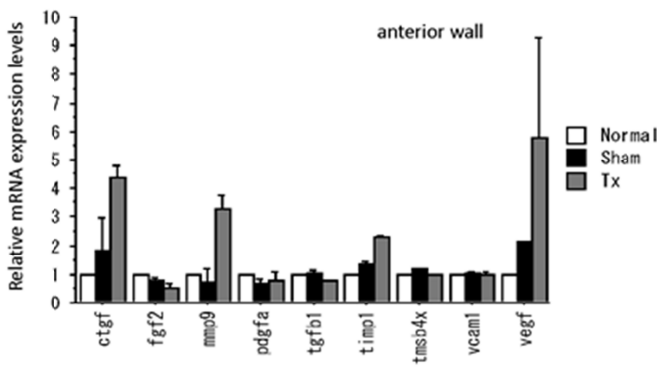
1)の実験の候補に含まれるb-FGFの徐放投与実験を行った。結果、ラット慢性期心筋梗塞モデルにおいても血管新生効果、及び、心機能の改善を認めた(図3)。また、ヒトiPS細胞由来心臓組織シートはマウスES由来心臓組織シート移植治療と同様に、ラット亜急性期心筋梗塞モデルにおいて血管新生、梗塞範囲の縮小、心機能の改善効果を認めた。

ラット心筋梗塞モデルに対して、マウスES由来心臓組織シート移植治療の系を用いて、治療メカニズムの検討を行ってきた。ヌードラットを心筋含有シート治療群と心筋を除いた内皮・血管壁細胞シート移植群、非治療(sham手術)群の3群に分類し移植、またはsham手術を行った。この結果、心筋細胞の存在するシート移植群において、心機能や血管新生といった治療効率の著名な改善効果があることを見出した。一方、ヒトiPS細胞においても、心筋を含む心血管系細胞をまとめて分化誘導し、心筋含有シートを作成し、ラット心筋梗塞モデルに移植することで心機能が改善することも示した。さらに、ヒトiPS細胞においても高純度な心筋、内皮細胞、血管壁細胞を個別に分化誘導する方法も確立した。これにより、ヒトiPS細胞由来心臓組織シートにおいても、細胞種ごとに効果やメカニズム解析を行うことが可能となった。

結語

本研究では心不全治療創薬の候補の効果の一部を示すとともに、心不全治療創薬のスクリーニングを確立することができた。

In-vivo mRNA expression (qRT-PCR)



In-vivo mRNA expression in the infarcted tissue from rat hearts 2 days after treatment (SYBR green)

図1

DNA microarray
(GeneChip® Rat Gene 1.0 ST Array)

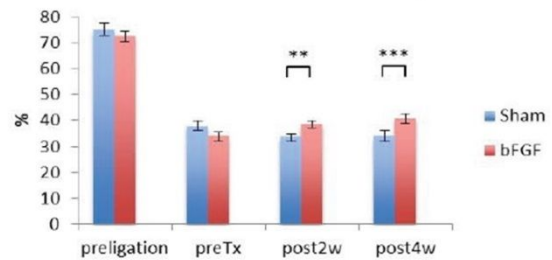
Transcript ID	Genesymbol	Fold change	Regulation	Tx	Ctrl Tx
10778247	Myl7	15.974145	up	1479.461	730.52496
10735331	Eno3	11.518993	up	4033.6804	1897.693
10876060	Aqp7	10.414869	up	1256.2979	967.8796
10783686	Myh6	9.612544	up	6572.356	4533.74
10802970		9.327447	up	2138.9978	346.1411
10778220	Pgam2	8.656308	up	1666.1068	1186.1777
10805092	LOC684108	8.48856	up	1046.443	637.3669
10713382	Pym	8.460813	up	4800.266	3051.1719
10772986	Ppargc1a	8.154007	up	1170.3906	718.36884
10827094	Gbp1	7.954303	up	995.58136	665.7469
10701853	Txinb	7.942124	up	1243.2277	877.8067
10771649	Cxcl11	7.851146	up	1290.8192	1041.8912
10930616		7.738334	up	852.93994	88.83911
10846599		7.705258	up	1287.669	840.4167
10911742	Klhl31	7.676942	up	1081.2205	657.94836
10827484	Tnni3k	7.6202416	up	1243.3145	884.80054
10799622	Cdnf	7.5296354	up	626.3659	323.71213
10730475	Kcnp2 Kchip:	7.5232224	up	978.3526	710.4371
10937709	Asb11	7.457786	up	648.5495	446.44934
10814105	Cmb1	7.394525	up	2278.3625	1655.2777
10817331	Tmod4	7.360512	up	698.86816	450.26804
10825100	Car14	7.3283186	up	632.8006	358.26297
10789477	Adprh1 Grtp	7.2402573	up	1609.4755	1178.381
10922923	Tmem182	7.2347937	up	1820.0148	1009.1346
10906302	Cpt1b	7.0957623	up	2298.758	1656.1754

Tx, CEM sheet transplantation
Ctrl Tx, EM sheet transplantation

図2

* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

Fractional Area Change



Fractional Shortening

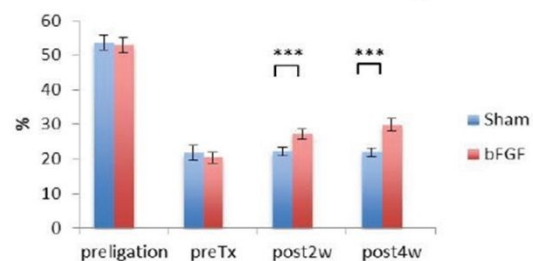


図3

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3件)

Masumoto H, Matsuo T, Ikeda T, Sakata R, Yamashita JK et al. Pluripotent Stem Cell-Engineered Cell Sheets Re-Assembled with Defined Cardiovascular Populations Ameliorate Reduction in Infarct Heart Function Through Cardiomyocyte-Mediated Neovascularization. *Stem Cells* 30: 1196-1205, 2012. (査読有)

Masumoto H, Sakata R Cardiovascular surgery for realization of regenerative medicine. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 60:744-755, 2012. (査読有)

Masumoto H, Yamashita JK Strategies in cell therapy for cardiac regeneration Inflammation and Regeneration 33:114-120, 2013. (査読有)

[学会発表](計26件)

升本英利、池田 義、坂田隆造、山下 潤 ほか . ラット心筋梗塞モデルへのヒト iPS 細胞由来心臓組織シート移植による心機能回復効果 . 第 11 回日本再生医療学会 . 2012.6.12-14 . 横浜市

升本英利、池田 義、坂田隆造、山下 潤 ほか . Mouse and human pluripotent stem cell - engineered cell sheets re - assembled with defined cardiovascular populations ameliorate reduction in infarct heart function through cardiomyocyte - mediated neovascularization. 第 4 回日本再生医療学会 YIA 受賞講演(基礎研究部門最優秀賞受賞) 2012.6.12 横浜市

Masumoto H, Ikeda T, Sakata R, Yamashita JK et al. Human induced pluripotent stem cell - engineered tissue sheets with defined cardiovascular cell populations ameliorate function after myocardial infarction. ISSCR 2012.6.13-16. Yokohama

升本英利、池田 義、坂田隆造、山下 潤 ほか . ヒト iPS 細胞由来心臓組織シート移植による亜急性期虚血性心疾患治療の可能性についての基礎的検討 . 第 33 回日本炎症・再生医学会 (最優秀ポスター賞受賞) 2012.7.5-7 . 京都市

Masumoto H, Ikeda T, Sakata R, Yamashita JK et al. Transplantation of cardiac tissue sheets including human induced pluripotent stem cell - derived defined cardiovascular cell populations ameliorates cardiac function after myocardial infarction. ESC(European Society of Cardiology)Congress 2012 .

2012.8.25-29 New Orleans, USA

Masumoto H, Ikeda T, Sakata R, Yamashita JK et al. Transplantation of cardiac tissue sheets including human induced pluripotent stem cell - derived defined cardiovascular cell populations ameliorates cardiac function after myocardial infarction. ESC(European Society of Cardiology)Congress 2012 2012.8.25-29 Munich, Germany

升本英利、池田 義、坂田隆造ほか ヒト iPS細胞から分化誘導した心臓構成細胞を含む細胞シート移植による亜急性期虚血性心疾患治療についての基礎的検討 第65回日本胸部外科学会定期学術集会(優秀演題). 2012.10.17-20 . 福岡市

Masumoto H, Ikeda T, Sakata R, Yamashita JK et al. Transplantation of cell sheets with human iPS Cell - derived cardiomyocytes and vascular cells for infarcted hearts: a basic study. American Heart Association, Scientific Sessions 2012 (AHA 84th) 2012.11.3-7 Los Angeles, USA

升本英利、池田 義、坂田隆造、山下潤 ほか Efficient differentiation of human iPS cells toward cardiovascular cell populations to generate bioengineered cardiac tissue - like cell sheets: a strategy for cardiac regeneration. 第35回日本分子生物学会年会(ワークショップ) 2012.12.11-14 . 福岡市

Ikuno T, Ikeda T, Sakata R, Yamashita JK et al. Efficient and Scalable Endothelial Cell Differentiation Method from Human Induced Pluripotent Stem Cells Based on 2-D Monolayer and Serum-Free Culture . ISSCR(International Society for Stem Cell Research) 11th Annual Meeting. 2013.6.14. Boston, U.S.A.

幾野 毅、池田 義、坂田隆造、山下潤 ほか . ヒト人工多能性幹(iPS)細胞からの効率的な内皮細胞分化誘導法 . 第 34 回日本炎症再生医学会 . 2013.7.2 . 京都

Ikuno T, Ikeda T, Sakata R, Yamashita JK et al. Efficient endothelial cell differentiation protocol from human induced pluripotent stem cells based on monolayer and serum-free culture for realization of vascular regenerative medicine . Rapid Fire - Remodelling the vessel wall . ESC Congress 2013. 2013.9.3. Amsterdam, Netherlands .

幾野 毅、池田 義、坂田隆造、山下潤 ほか . ヒト人工多能性幹(iPS)細胞からの効率的かつ高収量な内皮細胞分化誘導法 . 第 4 回 Molecular Cardiovascular Conference . 2013.9.7. 北海道.

幾野 毅、池田 義、坂田隆造、山下潤 ほか . 無血清二次元単層培養によるヒト iPS 細胞からの高効率高収量な内皮細胞分化誘導

法 . 第 21 回日本血管生物医学学会学術集会 . 2013.9.27 . 大阪

幾野 毅、池田 義、坂田隆造、山下潤ほか . ヒト iPS 細胞を用いた二次元単層培養による効率的な内皮細胞分化誘導法 . 第 66 回日本胸部外科学会定期学術集会 . 2013.10.19. 仙台

幾野 毅、池田 義、坂田隆造、山下潤ほか . 再生医療を見据えたヒト iPS 細胞からの効率的な血管内皮細胞分化誘導法 . 第 44 回心臓血管外科学会学術総会 . 2014.2.19. 熊本

幾野 毅、池田 義、坂田隆造、山下潤ほか . ヒト人工多能性幹(iPS)細胞を用いた効率的な高収量な二次元単層培養下血管内皮細胞分化誘導法 . 第 13 回日本再生医療学会総会 . 2014.3.5. 京都

Ikuno T, Ikeda T, Sakata R, Yamashita JK et al. Efficient and Robust Endothelial Cell Differentiation Methods from Human Induced Pluripotent Stem Cells Based on Monolayer and Serum-free Culture. 第 78 回日本循環器学会学術集会 . 2014.3.23. 東京

Ikuno T, Ikeda T, Sakata R, Yamashita JK et al. High-purity and scalable endothelial cell differentiation methods from human induced pluripotent stem cells based on monolayer and serum-free culture. the 18th International Vascular Biology Meeting (IVBM) 2014. Kyoto

Ikuno T, Ikeda T, Sakata R, Yamashita JK et al. Scalable and highly efficient endothelial cell differentiation methods from human induced pluripotent stem cells based on monolayer and serum-free culture for realization of regenerative medicine. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 12th Annual Meeting. 2014.6.20. Vancouver, Canada

①Ikuno T, Ikeda T, Sakata R, Yamashita JK et al. Scalable and highly efficient endothelial cell differentiation methods from human induced pluripotent stem cells based on monolayer and serum-free culture. ESC Congress2014. 2014.8.31. Barcelona, Spain .

②Ikuno T, Ikeda T, Sakata R, Yamashita JK et al. Scalable and highly efficient endothelial cell differentiation methods from human induced pluripotent stem cells for realization of regenerative medicine . 第 5 回 Molecular Cardiovascular Conference . 2014.9.6. 神戸.

③幾野 毅、池田 義、坂田隆造、山下潤ほか . 2 型血管内皮細胞増殖因子受容体陽性細胞の純化再培養によるヒト iPS 細胞からの血管内皮細胞分化誘導の効率化 . 2014.10.03. 福岡

④Ikuno T, Ikeda T, Sakata R, Yamashita

JK et al. Scalable and highly efficient endothelial cell differentiation methods from human induced pluripotent stem cells based on monolayer and serum-free culture for realization of regenerative medicine. The 18th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, 2015.1.15-17. 大阪

⑤幾野 毅、池田 義、坂田隆造、山下潤ほか . 2 型 VEGF 受容体陽性細胞純化再培養によるヒト iPS 細胞からの効率的血管内皮細胞分化誘導 . 第 45 回日本心臓血管外科学会学術総会. 2015.2.18 京都

⑥幾野 毅、池田 義、坂田隆造、山下潤ほか . 2 型 VEGF 受容体陽性細胞純化再培養はヒト iPS 細胞からの血管内皮細胞分化誘導を効率化する . 第 18 回日本再生医療学会総会. 2015.3.19 横浜

〔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
<http://www.kyoto-cvs.jp/study/01/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

坂田 隆造 (SAKATA RYUZO)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号 : 20325781

(2)研究分担者

池田 義 (IKEDA TADASHI)
京都大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号 : 40281092
山下 潤 (YAMASHITA ZYUN)
京都大学・iPS 細胞研究所・教授

研究者番号：50335288