

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 9 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790755

研究課題名(和文) エピジェネティック制御による機能的ヒトES/iPSC細胞由来心筋細胞の取得法の確立

研究課題名(英文) Epigenetic regulation induces the functional cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells

研究代表者

尾辻 智美(Otsuji, Tomomi G.)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・研究員

研究者番号：50564754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト多能性幹細胞由来の心筋細胞(hESC/iPSC-CMs)は、移植治療などへの実用化が最も期待されている組織細胞であるが、一般的に未成熟で胎児性心筋細胞と類似しており、成人の心機能とは異なる。今回、HDAC阻害剤の添加により、hESC/iPSC-CMsの心機能を亢進し、hERGチャネル阻害剤に対する応答性を改善できた。また、多能性幹細胞の攪拌の不必要な三次元培養法を開発し、効率的な増殖生産を可能とした。これらを組み合わせることで、実用化に必要な機能細胞の安定的な供給に大きく貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The cardiomyocytes (CMs) derived from Human ESC and iPSC (hESC/iPSC) are currently viewed as promising tools in regenerative medicine and pharmacological development. However, they are functionally heterogeneous, display insufficient biological efficacy and generally possess the electrophysiological properties seen in fetal CMs. Here, treating with a histone deacetylase inhibitor (HDACi) facilitates cardiac function in primitive hESC/hIPSC-CMs. HDACi-treated hESC/hIPSC-CM colonies showed appropriate responses to particular concentrations of known potassium ion channel inhibitors. In addition, we developed 3D sphere culture system without mechanical stirring for hESC/hIPSCs. Combination of these system may be optimized toward translation into a large-scale hESC/iPSC-CMs production format.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：移植・再生医療 ヒトES/iPSC細胞 心筋分化 心機能 機能細胞 大量培養法

## 1. 研究開始当初の背景

成体の心筋細胞は細胞周期から逸脱して増殖能力をほとんど失っているため、心筋梗塞などによる心筋細胞の傷害は修復されず、恒久的機能不全や心不全を呈する。近年、心筋組織再生のための細胞ソースとして、骨髄由来幹細胞や骨格筋芽細胞、胚性幹 (embryonic stem : ES) 細胞 (Thomson et al., 1998, Suemori et al., 2006) や近年樹立された人工多能性幹 (induced pluripotent stem) 細胞 (Takahashi et al., 2007) が注目されている。特に、ES 細胞や iPS 細胞は多能性を保持したまま、培養下で無限に増殖できる細胞株であるため、ヒト多能性幹細胞由来の心筋細胞 (hESC/iPSC-CMs) は、移植治療だけでなく創薬スクリーニングや疾患メカニズムの解明のモデル細胞としての利用が期待されている。これまでに、その分化誘導法は多くの研究室により確立・改良され、拍動を有する心筋細胞が取得可能である (Rajala et al., 2011) が、腫瘍形成の危険性や移植細胞の定着性、細胞の純化などの課題が残されている。一般的に、hES/iPSC-CMs は、未成熟で胎児性心筋細胞と類似しており、機能的にも構造的にも成人心筋細胞と異なることが報告されている (Snir et al., 2003, Vidarsson et al., 2010, Zhang et al., 2009)。さらに成人由来と胎児由来の心筋前駆細胞では、その分化能力に差があり、電気生理学的に成熟した心筋細胞は成人由来心筋前駆細胞より生じるという報告がある (Vliet et al., 2010)。電気生理学的に未成熟・未分化な細胞の移植は、新たな不整脈の原因となる可能性があることから (Kehat et al., 2004, Miragoli et al., 2007)、生理学的電気特性を十分に有する再生心筋細胞の誘導法の確立およびこれらの細胞を効率よく大量かつ安全に確保できる技術が必要である。

## 2. 研究の目的

近年、iPS 細胞の樹立法を応用して組織の

鍵となる遺伝子の直接導入による繊維芽細胞の心筋細胞へのダイレクトプログラミング法の確立 (Takeuchi et al., 2009, Ieda et al., 2010) やクロマチン制御による心筋発生および疾患への関与が明らかとなり (Hang et al., 2010)、クロマチンを適切に制御することが機能細胞取得の鍵となることが予想される。また浮遊培養条件下の胃がん細胞は、接着培養条件下の細胞よりヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の活性が低く、結果ヒストンのアセチル化レベルが高いことが示されており (Kim et al., 2005)、hESC-CMs においても浮遊培養は心筋特異的遺伝子の発現誘導を明白に引き起こした (Otsuji et al., 2010)。これらのことから、クロマチンを制御する化合物の添加により長期培養や浮遊培養を介さず成人心筋に近い機能的 hESC-CMs の取得を目指す。また、ヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞の大量培養法を確立し、組み合わせることで、機能細胞の移植に必要な細胞数の獲得を試みる。

## 3. 研究の方法

hESC-CMs の長期再接着培養では、心筋特異的遺伝子の発現レベルの増強が認められ、これに伴い、MEA 測定における薬剤応答性は、in vivo を反映した適切な応答、つまり頻脈ではなく QT 延長を示した。また、浮遊培養は短期間 (二週間) で明確に hESC-CMs の心筋特異的遺伝子の発現誘導を引き起こした (Otsuji et al., 2010)。これらのことから、接着培養条件下で化合物添加により浮遊培養を再現できれば、hESC-CMs の心機能の亢進へと繋がると考えられる。浮遊培養条件下の胃がん細胞では、接着細胞と比較して、ヒストンアセチル化レベルの増強が認められることから (Kim et al., 2005)、クロマチンを制御する化合物の添加が機能的 hES/iPSC-CMs の短期間での取得に最適であると考える。

また、ヒト多能性幹細胞の実用化に向けて、細胞の効率的な確保や品質を維持管理して

培養する方法として、ヒト多能性幹細胞の新規大量培養法の確立が必要である。つまり、スタート時の細胞数を増やすことができ、これらの技術を組み合わせることで、機能細胞を効率よく大量に確保できる技術であると期待する。

#### 4. 研究成果

HDAC 阻害剤の添加により接着培養条件下で浮遊培養の状態を再現できるかを検討した結果、ヒストンのアセチル化レベルの増強および心筋特異的遺伝子の発現増強を誘導できた。次に、細胞外電位(MEA)を用いた機能解析では、分化誘導間もない未成熟な hESC-CM コロニーは、hERG チャネル阻害剤である E4031 に対して QT 延長や頻脈を示し、その応答性は同質でなかった。これらを HDAC 阻害剤で処理すると、すべての hESC-CM コロニーにおいて QT 延長が認められた。いくつかの HDAC 阻害剤を添加では、拍動数に対する応答性の違いが認められた。つまり、より効果的な化合物の同定により、エピジェネティックな制御が機能細胞の獲得に貢献することが示唆される。さらに、再生医療などへの実用化には、均質な細胞の大量供給が求められる。一般的に成体心筋細胞はその増殖能力を失っているため、大量の機能細胞の獲得に、多能性幹細胞の大量培養法の開発が不可欠である。しかし、多能性幹細胞の浮遊培養系では、攪拌による細胞ダメージのため、効率的な増殖生産はできなかった。今回、機能性高分子の使用で、細胞塊を三次元的に浮遊し、攪拌の不必要な三次元培養法の開発し、効率的な増殖生産を可能とした。これらを組み合わせることで、実用化に必要な機能細胞の安定的な供給に大きく貢献することが期待できる。

#### 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. Otsuji T.G., Kurose Y., Suemori H., Tada M., Nakatsuji N.

Dynamic link between histone H3 acetylation and an increase in the functional characteristics of human ESC/iPSC-derived cardiomyocytes.

*PLoS One*, **7** e45010 (2012)

2. Minami I., Yamada K., Otsuji T.G., Yamamoto T., Shen Y., Otsuka S., Kadota S., Morone N., Barve M., Asai Y., Tenkova-Heuser T., Heuser J.E., Uesugi M., Aiba K., Nakatsuji N.

A small molecule that promotes cardiac differentiation of human pluripotent stem cells under defined, cytokine- and xeno-free conditions.

*Cell Rep.*, **2** 1448-1460. (2012)

3. Otsuji T.G., Jiang, B., Yoshimura A., Tomura M., Tateyama D., Minami I., Yoshikawa Y., Aiba K., Heuser J.E., Nishino, T., Hasegawa, K., Nakatsuji, N.

A 3D Sphere Culture System Containing Functional Polymers for Large-Scale Human Pluripotent Stem Cell Production  
*Stem Cell Rep.*, **2** 734-745. (2014)

4. 尾辻智美, 西野泰斗, 中辻憲夫  
機能性高分子を利用したヒト ES/iPS 細胞の大量培養技術 -物理化学と再生医療との融合  
月刊化学 69(9) 24-27 (株)化学同人、京都 (2014)

5. 尾辻智美, 中辻憲夫

多能性幹細胞の実用化に向けた新規三次元培養法

バイオサイエンスとインダストリー (B&I) 73(5) (一財)バイオインダストリー協会、東京 (2015)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Otsuji, T.G., Kurose, Y., Suemori H., Tada, M., Nakatsuji, N.

Chromatin modification facilitates functional maturation in human ESC/iPSC-derived cardiomyocytes  
CLS-iCeMS Joint Symposium, Crossing Boundaries; Stem cells, Materials, Mesoscopic Sciences and Beyond  
China, Beijing, 2012 年 4 月 21 日

2. Jiang, B., Otsuji, T.G., Kadota S., Minami, I., Nakatsuji, N.

A novel sphere culture system for human pluripotent stem cells  
CLS-iCeMS Joint Symposium, Crossing Boundaries; Stem cells, Materials, Mesoscopic Sciences and Beyond  
China, Beijing, 2012 年 4 月 21 日

3. Otsuji, T.G., Jiang, B., Yoshimura, A., Heuser, J.E., Hasegawa, K., Nakatsuji, N.

A novel sphere culture system for human pluripotent stem expansion  
RSC-iCeMS Joint International Symposium “Cell-Material Integration and Biomaterials Science”  
Japan, Kyoto, 2013 年 3 月

4. Otsuji, T.G., Jiang, B., Yoshimura, A., Tomura, M., Tateyama, D., Minami, I., Yoshikawa, Y., Aiba, K., Heuser, J.E., Nishino, T., Hasegawa, K., Nakatsuji, N.

3D sphere culture with functional polymers for large-scale human pluripotent stem cell production

日本再生医療学会 第 13 回総会  
京都市、2014 年 3 月 5 日

5. Otsuji, T.G., Jiang, B., Yoshimura, A., Tomura, M., Tateyama, D., Minami, I., Yoshikawa, Y., Aiba, K., Heuser, J.E., Nishino, T., Hasegawa, K., Nakatsuji, N.

3D sphere culture with functional polymers for large-scale human pluripotent stem cell production  
ISSCR 12th  
Canada, Vancouver, 2014 年 6 月 18 日

6. 尾辻 智美、吉村 安寿弥、戸村 美沙代、館山 大揮、南 一成、吉川 義洋、饗庭 一博、John E. Heuser、西野 泰斗、長谷川 光一、中辻 憲夫

ヒト多能性幹細胞の大量培養を目指した攪拌の不必要な三次元スフェア培養法  
日本分子生物学会 第 37 回年会  
横浜市、2014 年 11 月 27 日

〔図書〕(計 1 件)

1. 尾辻智美、中辻憲夫  
ヒト多能性幹細胞の新規三次元培養技術  
三次元ティッシュエンジニアリング技術最前線 (監修 : 大政健史、福田淳二) 165-171  
株式会社 エヌ・ティー・エス、東京 (2015)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称 : 培地組成物及び当該組成物を用いた細胞又は組織の培養方法

発明者 : 中辻憲夫、尾辻智美、西野泰斗、猿橋康一郎、戸村美沙代、岩間武史、堀川雅人

権利者：  
種類：  
番号：PCT/JP2013/070001  
出願年月日：2013年7月24日  
国内外の別：国内

取得状況（計 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

1. 中辻憲夫、尾辻智美  
多能性幹細胞 見えた！大量培養  
JST サイエンスニュース  
2014年10月21日

2. 中辻憲夫、尾辻智美  
多能性幹細胞 見えた！大量培養  
JST サイエンスニュース 英語版  
2015年3月3日

6. 研究組織

(1)研究代表者

尾辻 智美 (OTSUJI TOMOMI)  
京都大学 物質-統合システム拠点 研究員  
研究者番号：50564754

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：