

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560251

研究課題名(和文) 生体幹細胞ニッチを保持した人工ECMによる自己幹細胞からの拍動心筋細胞分化誘導

研究課題名(英文) Beating cardiomyocyte induction from iPS cells on acellular cardiac tissues with native biological niche

研究代表者

山岡 哲二 (Yamaoka, Tetsuji)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：50243126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：心筋梗塞などに対して患者自身の間葉系幹細胞などを移植する再生医療が注目されている。しかしその効果は、細胞多産生する有用成分にもとづくものであり、また、その効果も十分ではない。そこで、さらに高い治療効果を目指して、iPS細胞から拍動する心筋細胞などの機能性細胞を誘導して移植する治療法が注目されている。本研究では、ブタ等の組織(心筋・肝・能)から細胞成分を取り除いた脱細胞マトリックスをiPS分化基材として用いることでその有用性を確認した。

研究成果の概要(英文)：Regenerative medicine to transplant various autologous stem cells such as mesenchymal stem cells is attracting great attention for treating myocardial infarction or other diseases. However, its effect is known to be the paracrine effect and is not satisfactory. Therefore, as a more effective strategy, transplantation of the functional cells such as beating cardiomyoblasts induced from the induced pluripotent stem cells have been proposed. In this project, we confirmed the usefulness of acellular tissue derived from porcine heart, liver, and brain as the cell culture matrix in iPS differentiation induction.

研究分野：再生医療

キーワード：細胞 組織工学材料

### 1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞に対する細胞移植療法が精力的に検討され、比較的风险が低い自己骨格筋芽細胞や自己骨髄由来間葉系幹細胞が注目されてきたが、その効果は満足できるものではない。さらに高い治癒効果を得るために、拍動する心筋細胞が有用と考えられている。本研究では、自己由来幹細胞から高効率で拍動心筋細胞を誘導するための人工ニッチ基材を開発することを目指した。自己由来幹細胞として、主に iPS 細胞を選択し、様々な培養基材が自己拍動心筋細胞分化効率に与える影響を検討する必要がある。

骨髄由来間葉系幹細胞からの心筋細胞誘導に関する多くの報告があるが、GATA 4 などの心筋マーカーは陽性であっても、多く場合は自己拍動しない。我々は、懸濁誘導システムを開発し間葉系幹細胞から拍動心筋細胞を作出することに成功したが、その効率は低かった (Miskin et al. Tissue Engineering C (2010))。一方、培養基材の力学特性が幹細胞分化に影響することが注目されている。

### 2. 研究の目的

我々は、弾性率だけでなく ECM の種類も分化効率に影響することを見出したことから、本研究では、生体内の心筋細胞ニッチを可能な限り正確に再現するために、心筋組織そのものを心筋分化ニッチとして利用した。すなわち、ヒト心筋組織と類似のサイズ・組成を有するブタ心筋組織から細胞成分を除去して ECM 成分のみを残した脱細胞心筋組織を心筋分化人工ニッチとして使用した。我々が有する脱細胞技術は化学物質を利用しないことから、細胞に与える影響が無視小であり、細胞接着・細胞浸潤性にも優れる (国循特許 4092397・日豪韓加中にて特許化完了)。さらに、これら脱細胞組織上への細胞接着性を向上させるために、型コラーゲン・エラスチン・あるいは細胞接着性合成ペプチドによる表面修飾を検討した。

### 3. 研究の方法

研究方法は、脱細胞化ブタ心筋組織の作成 (非化学物質的脱細胞処理)、脱細胞化心筋組織への細胞接着ペプチド複合化 (バイオインスパイアード表面)、間葉系幹細胞および iPS 細胞の基材上での培養と分化誘導処理、心筋分化 (RT-PCR, 免疫染色)・拍動挙動 (染色、電気生理) 出構成される。その概要を図 1 に示した。ブタ心臓壁組織を、目的の大きさで目的の方向からスライスした組織切片を作成し、以下に示す脱細胞化技術により処理し、表面への細胞接着リガンド導入を行う。これを、ダブルチャンパー法 (図 1 の手法) により、培養基材に固定化し、間葉系幹細胞および、

iPS 細胞を培養し、分化誘導特性を評価する。心筋組織の対象として、肝臓および腎臓組織スライスも同様に作成し分化リネージを比較検討する。

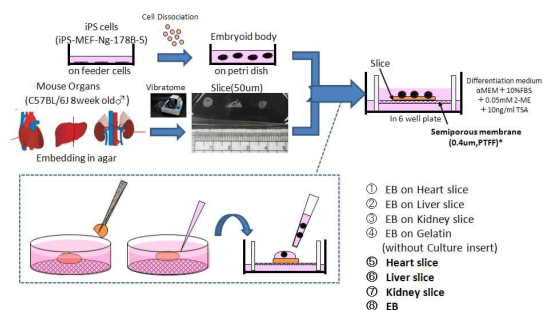


図 1 脱細胞組織上での iPS 分化実験

### 脱細胞化ブタ心筋組織の作成

ブタ心筋組織を、ビブラトームを用いて X/Y/Z 軸方向にスライスすることで、心筋組織繊維の走行の異なる脱細胞心筋組織を調製して、生理食塩水に浸漬し、ピニールバッグ加熱シーリングにより密閉する。10,000 気圧の圧力を 10 分間、30℃ 下で印加し、生理食塩水で 2 回洗浄し、3 日間、所定濃度の DNaseI と MgCl<sub>2</sub> 溶液を添加した洗浄液で洗浄し、その後、EDTA 添加溶液で十分に Mg イオンを除去する。脱細胞の程度は、HE 染色及び DNA 定量により行ない、脱細胞組織の力学的考察は引っ張り試験など常法に従って行ない、ネイティブ組織との相同性を注意深く検証した。

### iPS 細胞の基材上での培養

iPS 細胞についてはラット由来ではなく、研究情報の多いマウス iPS 細胞株を選択し、最終年度の移植予備実験に際しては、ヌードラットを利用する方針とする。マウス iPS 細胞株としては、4 つの遺伝子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) および 3 つの遺伝子 (Oct3/4, Sox2, Klf4) が導入された 2 種類の細胞株 (492B4, 178B5) を用いる。これらは、心筋分化特性が異なることが既に報告されている。細胞播種方法として、single 細胞法および胚様体 (Embryoid body; EB) 形成法を用いる。また培地には、血清を 15% あるいは 20% 含有する LIF 不含有 iPS 細胞培地、および TSA (ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤) を含有する -MEM 培地の 3 種類を用いる。心筋細胞への分化効率の指標には GATA4 等の分化マーカーに加えて、拍動関連タンパク遺伝子発現を選択した。

### 心筋分化拍動の評価

拍動コロニーの出現率および拍動維持期間では、目視による誤差を避けるために、カルシウムインジケータを用い、心筋細胞の細胞の拍動に伴った蛍光強度変動パタ

ーンにより解析する(図2右上グラフ)。エレクトロカルディオグラムでは、目的コロニーの物性を確認に優れるが、本蛍光法により全体的なコロニー出現数の定量のみならず、コロニー中で実際に拍動に供している細胞の特定が出来る優れたシステムである。

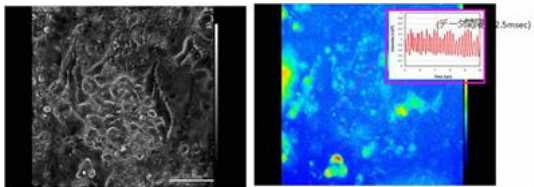


図2 拍動を始めた iPS 細胞と(左)とカルシウム濃度による拍動の定量的解析(右)

#### 4. 研究成果

【脱細胞化組織の HE 染色と DNA 定量】  
脱細胞化組織が脱細胞化されているかを確認するために HE 染色および DNA 定量評価を行った。脱細胞化処理後には核染色像が見られず、また、DNA 定量評価によって細胞成分の除去が確認された。

【脱細胞化組織の MT 染色と銀鍍染色】  
脱細胞化組織が脱細胞化前の力学特性を保持しているかを確かめる為に、マッソントリクローム染色と銀鍍染色を行った。脱細胞化処理後には、核染色像が見られなくなったが、青く染まるコラーゲン (WT 染色 A) および 型コラーゲン (鍍銀染色 B) は明確に観察されるため、脱細胞化後も ECM 成分は残存している事が確認された。

【力学特性の評価】

さらに力学特性が脱細胞化前後で変化しているかを確かめる為、圧縮弾性率を求めた脱細胞処理前後において圧縮弾性率に有意な差は見られず、脱細胞化後においても弾性率が保持されている事が確認された。

【脱細胞化組織上での細胞の様子】

心筋分化誘導時の脱細胞化組織上の細胞をヘキスト染色で染めて観察した(図3)。

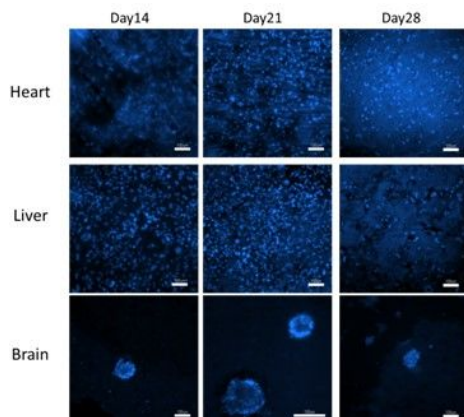


図3 脱細胞組織上での細胞の様子

脱細胞化心筋および肝組織上では細胞が一樣に広がって増殖する一方で、脱細胞化脳組織上では胚様体を形成していた。脳組織には脂肪が多く含まれ細胞が接着、伸展しにくいいため胚様体を形成したと考えられる。

【脱細胞化組織が iPS 細胞の心筋細胞分化に与える影響】

心筋細胞に特異的な遺伝子発現を、分化誘導後 14、21、28 日において、リアルタイム PCR を用いて評価した(Figure.5)。GATA4 (心筋分化マーカー)、MHC、MHC、TnT2、MLC2v、MLC2a(心筋拍動関連マーカー)を用いた。脱細胞心筋上で心筋発現関連遺伝子の上昇が確認されたが拍動細胞は誘導されなかった。

そこで一般的に用いられる。きわめて硬いコラーゲンコートポリスチレン培養皿 (col-TCPS) と比較し、モデル細胞である P19 細胞や胎児心筋細胞などを用いて検討を進めた。その結果、Col-TCPS 上では初期段階の心筋分化が活発に起こり、その後の拍動関連分化(成熟化)の過程で、柔軟勝つ生体内に近いニッチが要求されている様子が示唆された。心臓は発生の時期に応じてそのマトリックスの強度や組成が変わっていることから、今回のように成ブタ組織で無く、さらに生体内環境に近い状況を構築することが効果的であると考えられる。

#### 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 8 件)

- 1) Y. Tachibana, M. C. Munisso, W. Kamata, M. Kitagawa, M. H. Shiba, T. Yamaoka, Quick nuclear transportation of siRNA and in vivo hepatic ApoB gene silencing with galactose-bearing polymeric carrier, Journal of Biotechnology Vol.175, 2014, pp.15-21, 査読有  
DOI:10.1016/j.jbiotec.2014.01.029
- 2) M. C. Munisso, T. Yamaoka, Reliable assessment and quantification of the fluorescence-labeled antisense oligonucleotides in vivo, BioMed Research International, p.196837, 2014, 査読有  
DOI: 10.1155/2014/196837
- 3) A. Mahara, H. Chen, K. Ishihara, T. Yamaoka, Phospholipid polymer-based antibody immobilization for cell-rolling surfaces in stem cell purification system, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, Vol. 25, 2014, pp.1590-1601, 査読有  
DOI:10.1080/09205063.2014.936926

- 4) J-H. Seo, S. Kakinoki, T. Yamaoka, N. Yui, Directing stem cell differentiation by changing the molecular mobility of supramolecular surfaces, *Adv. Healthcare Materials*, Vol. 4, 2015, pp. 215-222, 査読有  
DOI: 10.1002/adhm.201400173
- 5) S. Kakinoki, Y. Sakai, T. Takemura, N. Hanagata, T. Fujisato, K. Ishihara, T. Yamaoka, Gene chip/PCR-array analysis of tissue response to 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer surfaces in a mouse subcutaneous transplantation system, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, Vol. 25, 2014, pp. 1658-1672, 査読有  
DOI: 10.1080/09205063.2014.939917
- 6) S. Kakinoki, J-H. Seo, Y. Inoue, K. Ishihara, N. Yui, T. Yamaoka, Mobility of the Arg-Gly-Asp ligand on the outermost surface of biomaterials suppresses integrin-mediated mechanotransduction and subsequent cell functions, *Acta Biomaterialia*, Vol. 13, 2015, pp. 42-51, 査読有  
DOI: 10.1016/j.actbio.2014.11.020
- 7) S. Kakinoki, T. Yamaoka, Single-step immobilization of cell adhesive peptides on a variety of biomaterial substrates via tyrosine oxidation with copper catalyst and hydrogen peroxide, *Bioconjugate Chemistry*, Vol.26(4), 2015, pp. 639-644, 査読有  
DOI:10.1021/acs.bioconjchem.5b00032
- 8) S. Kakinoki, J-H. Seo, Y. Inoue, K. Ishihara, N. Yui, T. Yamaoka, Mobility of the Arg-Gly-Asp ligand on the outermost surface of biomaterials suppresses integrin-mediated mechanotransduction and subsequent cell functions, *Acta Biomaterialia*, Vol.13, 2015, pp.42-51, 査読有  
DOI: 10.1016/j.actbio.2014.11.020

〔学会発表〕(計10件)

- 1) 徐 知勲, 柿木佐知朗, 山岡哲二, 由井伸彦, 分子運動性の異なるポリロタキサン表面上における間葉系幹細胞の分化特性, 第43回医用高分子シンポジウム, 2014年7月29日, 産業技術総合研究所 臨海副都心センター, 東京都
- 2) 柿木佐知朗, 坂井勇亮, 竹村太郎, 花方信孝, 藤里俊哉, 石原一彦, 山岡哲二 MPC ポリマー修飾表面が誘起する炎症関連遺伝子発現の変動, 第36回日本バ

イオマテリアル学会大会, 2014年11月18日, タワーホール船堀, 東京都

- 3) 徐 知勲, 柿木佐知朗, 山岡哲二, 由井伸彦, 動的ポリロタキサン表面における間葉系幹細胞の分化特性評価, 第36回日本バイオマテリアル学会大会, 2014年11月18日, タワーホール船堀, 東京都
- 4) 柿木佐知朗, 坂井勇亮, 本田義知, 橋本典也, 馬場俊輔, 藤里俊哉, 山岡哲二 bFGF の非共有結合的固定化による多孔質スキャホールドへの組織浸潤誘導, 第14回日本再生医療学会総会, 2015年3月20日, パシフィコ横浜, 神奈川県
- 5) 安田裕貴, 柿木佐知朗, 神戸裕介, 岩崎泰彦, 山岡哲二, 表面化学的特性の異なる多孔質体への軟組織浸潤誘導, 日本化学会第95春季年会, 2015年3月29日, 日本大学理工学部船橋キャンパス, 千葉県
- 6) Takayuki Tokushige, Yusuke Kambe, Atsushi Mahara, Yasuhiko Iwasaki, Tetsuji Yamaoka Myocardial differentiation of rat mesenchymal stem cells in elastin-like recombinant protein gels, 第64回高分子年次大会, 2015年5月27日-5月29日, 札幌コンベンションセンター, 北海道
- 7) 大高晋之, 北川和宜, 平田みつひ, 深沢今日子, 中沖隆彦, 石原一彦, 馬原 淳, 山岡哲二, 未分化 iPS 細胞の分離のための抗体固定化ポリマー被覆マイクロ流路の開発, 第44回医用高分子シンポジウム, 2015年7月27日-28日, 産業技術総合研究所 臨海副都心センター, 東京都
- 8) 徳重恭之, 神戸裕介, 馬原 淳, 岩崎泰彦, 山岡哲二, 間葉系幹細胞の心筋細胞分化を誘導するエラスチン様リコンビナントタンパクゲル, 日本バイオマテリアル学会 第10回関西若手発表会, 2015年8月5日, 関西大学, 大阪府
- 9) 徳重恭之, 神戸裕介, 馬原 淳, 岩崎泰彦, 山岡哲二, エラスチン様タンパクゲル中でのラット間葉系細胞の心筋分化培養, 第37回日本バイオマテリアル学会大会, 2015年11月9日-10日, 京都テルサ, 京都府
- 10) 佐々木瑞樹, 平田みつひ, 山岡哲二, 玉田靖, シルクフィブロイン上で培養した iPS 細胞の未分化維持, つくば医工連携フォーラム2016, 2016年1月22日, 産総研つくばセンター共用講堂, 茨城県

〔図書〕(計1件)

- 1) 橋本朋子, 玉田 靖, 山岡哲二, 高機能性繊維の最前線～医療, 介護, ヘルスケアへの応用  
シーエムシー出版, 103-112, 2014

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
該当なし

## 6．研究組織

(1)研究代表者  
山岡 哲二（YAMAOKA Tetsuji）  
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長  
研究者番号：50243126

(2)研究分担者  
平田 みつひ（HIRATA Mitsuhi）  
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・非常勤研究員  
研究者番号：80568452

(3)連携研究者  
該当無し