

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860554

研究課題名(和文)新規心筋特異的前駆細胞(CCP)を用いた心筋再生療法の開発

研究課題名(英文)Development of cardiomyocyte committed progenitor cell therapy for cardiac regeneration

研究代表者

武田 匡史(Takeda, Masafumi)

京都大学・iPS細胞研究所・研究員

研究者番号：40547501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、心筋特異的前駆細胞の表面マーカー(CCP)を同定した。そこで、フローサイトメトリーを用いてCCP陽性心筋特異的前駆細胞を純化し、それを用いて移植するための心筋特異的前駆細胞シートを作製した。さらに、そのCCP陽性心筋特異的前駆細胞シートを用いてラットを用いた心筋梗塞モデルに移植を行った。結果、CCP陽性心筋特異的前駆細胞由来の心筋を移植心に認め、CCP陽性心筋特異的前駆細胞移植治療の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found a cell surface molecule successfully marked a cell population with features of cardiomyocyte-committed progenitors (we tentatively called the molecule as CCP). We generated CCP+ cardiac progenitor cell sheet and transplanted it to rat MI model. As a result, we observed cardiomyocytes derived from CCP+ cardiac progenitor cells within injured heart. These results suggested that CCP+ cardiac progenitor cells transplantation might be a promising therapy for cardiac regeneration.

研究分野：循環器内科

キーワード：心臓再生

1. 研究開始当初の背景

我が国において心筋梗塞は年間約 8 万例、心不全による死亡は年間約 7 万例であり、心臓血管の疾患は日本人死因の第 2 位である。また心臓移植におけるドナー不足問題は根本的解決の見通しはなく、心臓移植以外の方法による真の心臓再生治療法の開発が期待されている。

我々のグループはこれまでに ES 細胞及び iPS 細胞を用いた心血管細胞の分化再生に関する研究を行い、まずマウス ES 細胞において Flk1(2 型血管内皮増殖因子受容体)陽性の中胚葉レベルの細胞を共通の前駆細胞として、心血管細胞の分化機構を経時的系統的に検討できる新しい実験系を構築した (Yamashita J et al, **Nature**, 2000)。特に心筋分化においては、高率に心筋細胞に分化する直近の心筋前駆細胞 (FCV 細胞) の同定に新たに成功している。(Yamashita JK et al, **FASEB J**, 2005) さらに iPS 細胞を用いた心血管細胞分化にもいち早く成功した (Narazaki G, Yamashita JK et al, **Circulation**, 2008)。これらを基盤として心筋シートを用いたラット亜急性期心筋梗塞モデルを用いた細胞治療法の開発 (Masumoto H, Yamashita JK et al, **Stem Cells**, 2012) などを行った。また、ヒト iPS 細胞の心筋分化誘導・純化についても新規方法を開発した。(Uosaki H, Yamashita JK et al **PLoS One**, 2011)。心筋細胞を含む細胞シートの亜急性期心筋梗塞モデルへの移植したマウス ES 細胞を用いた検討 (Masumoto H, Yamashita JK et al, **Stem cells**, 2012)においては、心機能の改善効果は認めるが、移植細胞は移植後 1 ヶ月ではほとんど失われる。そのため広範な部位での心機能の再生を望むのは現状では不可能と考えられた。しかし、従来は生後不変であると考えられていた心筋細胞もターンオーバーしていることが数々報告され(Bergmann O et al *Science*, 2009)、

幹細胞 前駆細胞 心筋細胞に至る心臓組織構築プログラムが成体内でも働いていると考えられる。しかし、その能力は限定的で心筋梗塞や心不全を自然に克服する能力はない。そこで中間段階の前駆細胞を外的に供給し、成体の持つ心臓組織構築プログラムの増強・強化を図り、同プログラムに沿って心筋細胞を大量に組織内に誘導することにより、現在の「分化心筋細胞の外的供給によって心筋量を増やす」という単純な戦略の限界をクリアできると考えられ、移植後の細胞間組織間相互作用の下、より生理的な形で組織形成を進めることにより、広範な心臓組織の再構築も可能な質的に全く異なる新しい治療戦略となり得るのではないか考えられた。

しかし、前駆細胞に関して心臓では、広く中胚葉系に分化する細胞群が同定されているが、心筋特異的な前駆細胞は報告されておらず、重要な研究ターゲットとされていた(Burridge PW et al, *Cell Stem Cell*, 2012)。

そこで、我々が開発した心筋分化誘導法 (Uosaki H, Yamashita JK et al **PLoS One**, 2011)を用い、細胞表面マーカーの同定を試みた。結果 (Cardiomyocyte-Committed Progenitor: CCP)と称する心筋特異的な前駆細胞の表面マーカーの同定に成功した。この細胞表面マーカーは、後期中胚葉から心筋の出現する限られた時期にのみ一過性に発現する傾向を有していた。その、CCP 陽性心筋特異的な前駆細胞の心筋分化能を *in vitro* にて評価するために、フローサイトメトリーを用い、また細胞表面マーカーに対する抗体を用いて、細胞を純化し、再培養を行った。再培養後、95%以上の高効率で cardiac troponin T 陽性的心筋細胞を得ることができた。また、*in vivo* において CCP 陽性心筋特異的な前駆細胞の心筋分化能を評価するために、免疫不全マウスの腎被膜下への投与を行った。結果は *in vitro* の結果同

様、移植した CCP 陽性心筋特異的前駆細胞はほぼ全て、cardiac troponin T 陽性の心筋に分化していた。この CCP 陽性心筋特異的前駆細胞移植治療法を開発することで重症心疾患の患者に対する新規の心筋再生治療となることが期待される。

2. 研究の目的

CCP 陽性心筋特異的前駆細胞シートを作成し、心筋梗塞モデルまたは、慢性期心不全モデルを用いて、心機能改善効果を検討し、新規の心筋再生治療法を開発すること。

心臓における幹細胞/前駆細胞システムの動きを究明すること。

新規に同定した CCP 陽性細胞を基に、遺伝子発現やエピゲノム状態を解析し心筋分化のメカニズムの解明を行う。

3. 研究の方法

FACS にて純化した CCP 陽性心筋特異的前駆細胞を用いてシートを作製する。そして、免疫不全ラットの冠動脈を結紮し心筋梗塞を作成し、CCP 陽性心筋特異的前駆細胞シート移植を行う。

上記移植後、移植心を継時的に採取し、CCP 陽性心筋特異的前駆細胞から心筋細胞に分化する過程を評価する。

hiPS 細胞から心筋に至る過程において未分化 hiPS 細胞、早期の中胚葉、CCP 陽性心筋特異的前駆細胞、心筋細胞をそれぞれ FACS にて純化し、遺伝子発現ならびにエピゲノムの比較解析を行う。

4. 研究成果

FACS にて純化した CCP 陽性心筋特異的前駆細胞シートを作成した。現在それを用いて、冠動脈を結紮し心筋梗塞を作製した免疫不全ラットを用いて移植検討を進めており、一部 CCP 細胞由来の cardiac troponin T 陽性の心筋細胞を梗塞心筋に認

め、今後、心機能改善効果ならびに、移植後の継時的な変化を組織学的に検討を行い、心臓における幹細胞/前駆細胞システムの動きを含め検討を進めていく必要があると考えている。

hiPS 細胞から心筋細胞を誘導する過程で、未分化 hiPS 細胞、CCP 陰性早期の中胚葉細胞、CCP 陽性心筋特異的前駆細胞、心筋細胞をそれぞれ FACS にて純化を行った。現在、心筋分化の過程における各段階の細胞の遺伝子発現プロファイルならびにエピゲノムの変化に関する解析を進めており、CCP を基にした新たな心筋分化メカニズムに迫ることができる可能性があると考え今後の重要な研究課題となると考えられる。

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 0 件)

[学会発表](計 8 件)

1. 武田 匡史、山下 潤 ヒト iPS 細胞由来心筋特異的前駆細胞の同定 第5回 Molecular Cardiovascular Conference . 2014.9.5-6, 神戸
2. 武田 匡史 山下 潤 : iPS 細胞由来新規心筋特異的前駆細胞表面マーカーの同定第15回再生医療学会 (2015.3.19-21 Yokohama)
3. Takeda, M., Yamashita, JK.: A newly identified cardiomyocyte-committed progenitor population as a promising cell source for cardiac regeneration 第79回日本循環器病学会 (2015.4.24-26 Osaka)
4. Takeda, M., Yamashita, JK.: A newly identified cardiomyocyte-committed progenitor population for cardiac regeneration International Society for

Stem Cell Research (ISSCR) 2015
(2015.6.24-27 Stockholm, Sweden)

5. 武田 匡史 山下 潤: ヒト iPS 細胞由来新規心筋特異的前駆細胞表面マーカーの同定 第 35 回炎症・再生医学会 (2015.7.21-22 Tokyo)
6. 武田 匡史、山下 潤 ヒト hiPS 細胞由来心筋特異的前駆細胞表面マーカーの同定 第 6 回 Molecular Cardiovascular Conference . 2014.9.4-5, 福岡
7. 武田 匡史 山下 潤: ヒト iPS 細胞由来新規心筋特異的前駆細胞表面マーカーの同定 第 16 回再生医療学会 (2016.3.17-19 Osaka)
8. Takeda, M., Yamashita, JK.: Identification of hiPS-derived cardiomyocyte-committed progenitor (CCP) population as a promising cell source for cardiac regeneration 第 80 回日本循環器病学会 (2016.3.18-20 Sendai)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 匡史 (TAKEDA, Masafumi)

京都大学 iPS 細胞研究所・研究員
研究者番号 40547501

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者