

Banyu Foundation Research Grant 2011—生活習慣病領域—

研究成果報告書(最終) <概要>

所 属	立命館大学生命科学部生命医科学科 (申請時:京都大学学際融合教育研究推進センター生命科学系キャリアパス形成ユニット)
氏 名	川村 晃久
研究テーマ	iPS 細胞誘導技術を応用した新規心筋細胞作製法の開発と生体イメージングによる安全性評価に関する研究

- ・ 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- ・ 概要の構成は自由とするが、研究目的、手法、成果など、一般の方にもわかりやすくすること。
- ・ 枚数は1ページにまとめること。(図表、写真などの添付を含む)

(背景と目的)

重症心不全の予後は極めて悪く、喪失した心筋細胞を補う心臓再生療法の実現化が急がれている。人工多能性幹(iPS)細胞は、無限増殖能と多分化能を有しているため患者由来心筋細胞のソースとして強い期待が寄せられている。一方で、低い樹立効率、株間の質の相違、心筋細胞への分化効率の低さ、移植後腫瘍形成など種々の問題が残されており実用化への障壁となっている。これらの問題を解決するために、申請者は、iPS 細胞形成(=初期化)に関わる分子機構の解析をすすめ、最近、iPS 細胞誘導過程で生じる多様な非初期化細胞集団の中から、移植後腫瘍形成が低く多数の心筋細胞が誘導される新規の集団を同定した。本研究では、この細胞集団の特性解析を通じて誘導条件を改良し、未分化 iPS 細胞を樹立せずに十分量の安全な心筋細胞を効率的かつ俊敏に作成する。その効果と安全性の確認のため、光イメージングを利用して心臓内移植細胞の挙動を生体で時空間的に追跡し、次世代心臓再生療法の基盤を構築する。

(研究手法)

マウスおよびヒト繊維芽細胞に初期化因子をウイルスベクターを用いて遺伝子導入する。初期化誘導過程で出現する心筋細胞誘導候補となる細胞群(X+ Y+ 細胞)をセルソーターを用いて選別する。心筋細胞への分化培養を継続し、免疫染色、Ca イメージング、細胞移植実験、ルシフェラーゼ活性を用いた生体リアルタイムイメージングなどの実験を行う。

(研究成果)

マウス繊維芽細胞にレトロウイルスを用いて、初期化因子を発現させ iPS 細胞誘導早期(5日目)より出現する、心筋前駆細胞様の集団となりうる2つのマーカーXとYを同定した。誘導5日目に、セルソーターにより細胞を選別し培養を継続したところ、XY 二重陰性群と比べ、XY 二重陽性群からは Nanog 陽性 iPS 細胞コロニーの出現効率は極めて低かった。これらの細胞集団は、特定の培養条件下で、10回程度まで継代可能であり、心筋前駆細胞様のスフィア形成能を維持し、接着培養により自己拍動する心筋細胞へ分化することが確認された。特筆すべきは、自己拍動率や心筋特異的遺伝子発現により評価したところ、XY 二重陽性群が最も心筋分化効率が高かった。実際に、この細胞群により誘導された心筋細胞は、心筋特異的収縮タンパク質を発現しており、細胞内 Ca 濃度の周期的変動が観察され電気的な活動能を保持していることが示唆された。次に、これらの細胞群の腫瘍形成能の有無を評価する目的で、免疫不全マウスへの移植実験を行った。XY 二重陽性群由来の細胞は、サイズ・重量ともに XY 二重陰性群と比べ、腫瘍形成能に乏しいことが確認された。一方で、XY 二重陰性細胞は病理学的に奇形腫瘍の組織像が観察された。最後に、生体リアルタイムイメージングにより、移植細胞の運命を同一個体で時空間的に追跡する目的で、全身にホタル発光酵素ルシフェラーゼを発現するマウスから繊維芽細胞を採取して初期化誘導を行った。XY 二重陽性群由来の細胞は XY 二重陰性群と比べ、腫瘍性増殖を示さないことが確認された。

以上の結果から、iPS 細胞誘導過程で出現する、XY 二重陽性細胞群は、安全かつ効率的な心筋再生のための新たな細胞ソースになると期待される。

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ・ 国内外を問わない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2013年6月28～30日	18th Annual Scientific Meeting of the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy. Sogo T, Shigeno A, Maruno T, Hasegawa K, Kawahara M, Ueda H, Nagamine T, <u>Kawamura T</u> . Functional regulation of Wnt3a signaling for an efficient and economical production of cardiac myocytes from mouse ES cells using chimeric receptors for Wnt3a
2	2013年3月29日	日本薬学会第133年会(シンポジウム:心不全の病態解明と次世代治療薬の探索) <u>川村晃久</u> 「初期化誘導技術を応用した次世代心筋再生治療薬の開発」
3	2013年3月22日	第12回日本再生医療学会 十河孝浩、重野麻子、丸野敬晃、河原正浩、上田宏、長棟輝行、 <u>川村晃久</u> 「古典的 Wnt シグナルを伝達する小分子応答性人工受容体の作製と、その多能性幹細胞への応用」
4	2013年3月21日	第12回日本再生医療学会 重野麻子、十河孝浩、加藤 格、長谷川浩二、中畑龍俊、 <u>川村晃久</u> 「表面マーカーによる初期化成功・不成功群の解析」
5	2012年7月6～7日	第33回日本再生炎症学会 <u>川村晃久</u> 、十河孝浩、尾野 亘、加藤格、長谷川浩二、中畑龍俊 「初期化誘導過程で出現する心筋前駆様細胞を用いた安全かつ効率的な心筋再生療法の確立」
6	2012年7月6～7日	第33回日本再生炎症学会 <u>川村晃久</u> 、十河孝浩、上辻麻子、加藤格、長谷川浩二、戎家美紀、西田栄介、中畑龍俊 「表面マーカーによる初期化成功予測因子の解析」
7	2012年3月16～18日	第76回日本循環器学会学術集会 Sogo T and <u>Kawamura T</u> . Efficient production of cardiac myocytes from ES cells and iPS cells using small molecule-responsive artificial receptors for Wnt3a signal transduction.
8	2012年3月16～18日	第76回日本循環器学会学術集会 <u>Kawamura T</u> , Hasegawa K, Ono K, Sogo T. Identification of the novel cardiac progenitor-like cell population by modifying the process of somatic cell reprogramming.
9	2011年11月12～16日	第84回アメリカ心臓病学会年次学術集会 Sogo T, Shigeno A, Maruno T, Hasegawa K, Kawahara M, Ueda H, Nagamine T, <u>Kawamura T</u> . Economical and efficient production of cardiac myocytes from ES cells and iPS cells using small molecule-responsive artificial receptors for Wnt3a signal transduction.
10	2011年9月21～24日	第84回日本生化学会 十河孝浩、重野麻子、丸野敬晃、長谷川浩二、河原正浩、上田宏、長棟輝行、 <u>川村晃久</u> 「経済的かつ効率的な心筋再生療法のための、Wnt3aシグナルを伝達する人工受容体の作製」

11	2011年9月14~16日	化学工学会 第43回秋季大会 十河孝浩、重野麻子、丸野敬晃、長谷川浩二、河原正浩、上田宏、長棟輝行、川村晃久「古典的Wnt経路を伝達する人工受容体を用いた経済的な心筋再生療法の確立」
3. 投稿、発表予定		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	2013年2月	Koga M, Matsuda M, <u>Kawamura T</u> , Nishida E, Ebisuya M. Foxd1 is a mediator and indicator of the cell reprogramming process. <i>Nature Commun.</i> in minor revision.
2	論文投稿準備中	Kida YS*, <u>Kawamura T</u> *, Sogo T, Jacinto S, Shigeno A4, Liddle C, Ecker JR, Atkins AR, Yu RT, Downes M, Evans RM. ERR α / γ are Required for Somatic Cell Reprogramming. (*Equal contribution)
3	論文投稿準備中	Sogo T, Shigeno A, Maruno T, Hasegawa K, Kawahara M, Ueda H, Nagamine T, <u>Kawamura T</u> . Functional regulation of Wnt3a signaling for an efficient and economical production of cardiac myocytes from mouse ES cells using chimeric receptors for Wnt3a
4	論文投稿準備中	Sogo T, Shigeno A, Nakahata T, Kida Y, <u>Kawamura T</u> . Induction of a novel cell population contributing to cardiac progenitor cells with few risks of tumorigenesis by modifying reprogramming process.