

図2 T細胞の採取・培養

全血を遠心分離することで得られた単核球層を抗CD3抗体、インターロイキン2で刺激することにより、T細胞が活性化、増殖する。

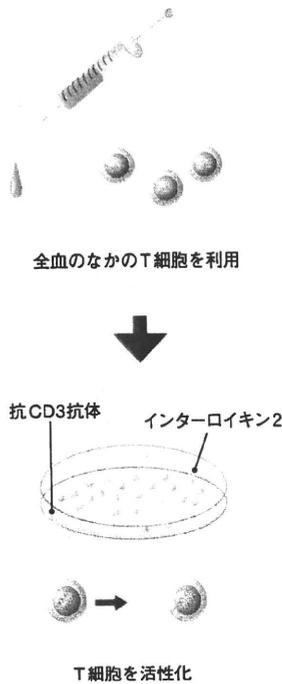
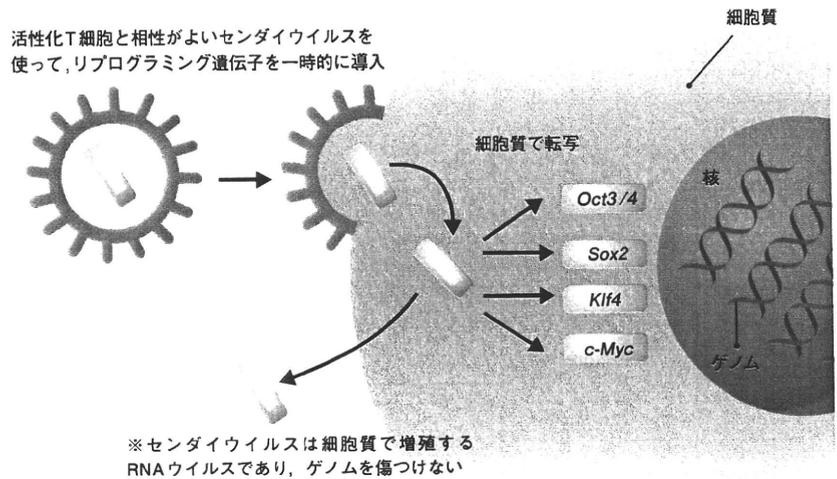


図3 センダイウイルスを用いた遺伝子導入

センダイウイルスは活性化されたT細胞に高効率で感染するという特徴をもつほか、細胞質で転写をおこなうため、ゲノムに挿入されないという性質をもつ。



グしたあとに再び活性化することが問題となっている。さらに移植の際に未分化細胞が混入することでも腫瘍を形成する危険があり、現時点でこのような問題を解決すべく世界中で驚異的なスピードで研究が進められている。

一方で、iPS細胞は患者の体細胞から樹立できるという利点から、難治性疾患を抱える患者からiPS細胞を作製し、目的臓器細胞へと分化誘導することで病的細胞を用いた疾患解析が可能であり、新たな研究ツールとしての可能性が期待されている。この疾患特異的iPS細胞の樹立、そしてその後の病的細胞解析の実験系の構築は、移植に際して問題となる腫瘍化の危険性の解決を待たずに達

成が可能であり、早い時期からの応用が期待されている。

末梢血T細胞からiPS細胞を樹立

2007年、山中教授らによる最初のヒトiPS細胞樹立の報告では、成人の皮膚由来の線維芽細胞が用いられていたが、最近の研究ではケラチノサイト⁽³⁾や造血幹細胞⁽⁴⁾などをはじめ、さまざまな体細胞を用いてのiPS細胞樹立が報告されている。しかし、このような方法を用いても、樹立に十分な細胞数を得るには、iPS細胞の材料となる細胞を患者の体から侵襲的に採取しなければならず、今まで患者からのiPS細胞の樹立という点

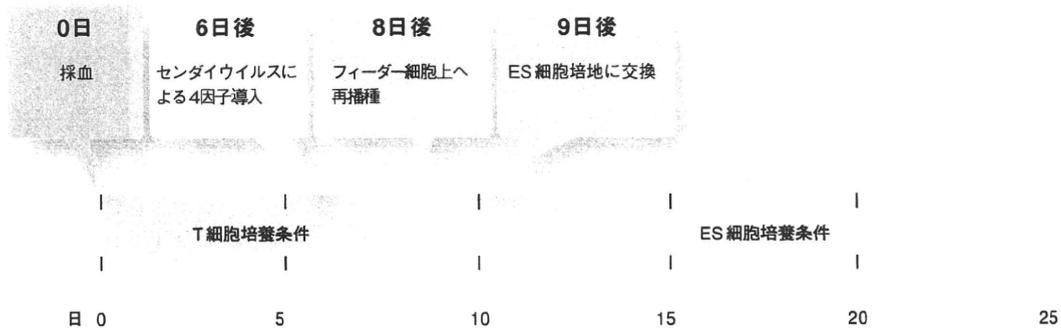
において大きな障害となっていた。

そこでわれわれは、臨床の現場で患者から採取することを踏まえ、より低侵襲かつ簡便にiPS細胞を樹立する方法を模索した。日常、臨床の現場では広く採血がなされ、さまざまな検査に使われている。採血という手技はありふれた細胞採取方法の一つであり、これまでのiPS細胞樹立に用いられてきた皮膚生検などと比べて低侵襲であるといえる。

われわれはこの採血検体に含まれるリンパ球の一つであるT細胞、および(-)鎖RNAウイルスであるセンダイウイルスがヒト活性化T細胞に高効率で感染することに注目し、センダイウイルスを用いて四つの遺伝子(*Oct3/4*、

図4 T細胞とセンダイウイルスを用いた樹立プロトコール

採血後6日目にセンダイウイルスによる遺伝子導入をおこない、8日目にフィーダー細胞上へ再播種、9日目からES細胞培養条件とした。採血後25日前後で、ES細胞様のコロニーの出現が認められた。



Sox2, Klf4, c-Myc) を導入し、末梢血T細胞からiPS細胞を樹立することに成功した⁽⁵⁾。われわれの確立した方法により微量の血液からのiPS細胞の樹立が可能となった。

iPS細胞樹立におけるT細胞、センダイウイルスの利点

われわれは、低侵襲かつ簡便・迅速・高効率で臨床応用可能なiPS細胞樹立方法をめざすにあたり、T細胞とセンダイウイルスという組合せに注目した。T細胞は、抗CD3モノクローナル抗体を培養皿の表面に定着させ、IL-2(インターロイキン2)を添加した培養液を用いて活性化することで、体外において培養や増幅が簡便にできることが知られている。このため、非常にわずかな血液からでも増殖させ、培養実験に十分な細胞数を得ることが可能である(図2)。また、増殖の速度は非常に早く、従来のように皮膚から線維芽細胞が遊出するのに必要な1か月近い培養期間を省くことがで

きる。その一方、T細胞は免疫をつかさどる細胞であり、その表面にあるT細胞抗原レセプター(TCR)^{*}1)によって抗原を特異的に認識する機構をもつ。T細胞はTCRがさまざまなレパートリーをもつことで抗原への特異性をもつが、このレパートリーを獲得する際に、抗原との結合に関与する遺伝子セグメントの組換え、この際におこる鋳型遺伝子に存在しない塩基の挿入という二つの機構によって遺伝子が再構成される。マウスにおいては、p53ノックアウトマウスのT細胞からのiPS細胞の樹立が報告されていたが⁽⁶⁾、ヒトT細胞から正常なヒトiPS細胞が樹立できるかという点は明らかではなかった。

また、iPS細胞樹立における遺伝子導入方法としては、当初報告されたレトロウイルスをはじめとしたウイルスによる方法のほか、ホストゲノムへの遺伝子挿入なしに樹立が可能であるエピソーマルベクター^{*(7)}やタンパク質⁽⁸⁾など

多くの方法が報告されている。われわれは、そのような報告のなかで、(-)鎖RNAであるセンダイウイルスを用いたiPS細胞の樹立法⁽⁹⁾に注目した。センダイウイルスは、細胞質にとどまって、RNAを転写してタンパク質を合成することから、導入された細胞の染色体に影響を与えず、挿入による遺伝子の変異や染色体構造変化の危険性がないという特徴をもつ(図3)。また、哺乳類の多くの細胞、組織に効率よく遺伝子を導入できるため、iPS細胞の臨床応用に向けて非常に期待される技術である。とくに興味深いことに、センダイウイルスは活性化していないヒトT細胞にはほとんど感染しないが、活性化ヒトT細胞には非常に高い感染効率を示すという特徴をもつ⁽¹⁰⁾。そこでわれわれは、ヒトT細胞を活性化したうえで、センダイウイルスを用いて四つの遺伝子、すなわちOct3/4, Sox2, Klf4, c-Mycを導入した(図4)。

FOOTNOTE

*1 T細胞抗原レセプター(TCR)

T細胞の表面に存在する受容体であり、T細胞が抗原を認識する際にMHC上に提示された抗原と結合し、細胞内にシグナルが伝達される。1個のT細胞には1種類のTCRが発現しており、個々のTCRが認識できるMHCと抗原ペプチドの組合せは1種類しか存在しない。TCRをコードする遺伝子は、遺伝子組換えで作られる。

採血後25日で 高効率にiPS細胞を作製

具体的には、まず採血された1mLの末梢血から遠心分離により赤血球や顆粒球を除き、抗CD3モノクローナル抗体でコーティングした培養皿の表面にT細胞を定着させ、IL-2を添加した培養液で活性化をしながら増幅させた。ついで、*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*の4遺伝子をセンダイウイルスをベクターとして活性化T細胞へ導入したところ、ウイルス感染から20日後、採血した日から起算して25日目にはES細胞様のコロニーが出現した(図5)。

これらの細胞はES細胞様の形態を保ったまま8か月以上、50回を超えて継代が可能であることを確認した。また、乳幼児からの樹立も視野に入れ、樹立に必要な血液量のさらなる検討をおこなった結果、0.1mLの全血をそのままT細胞増殖用の培養条件で培養したあとに遠心分離して、遺伝子導入することでも同様のコロニーが得られることを確かめた。さらに、検体の保存や輸送を考慮し、24時間常温で放置した全血検体や、-150℃で凍結保存したリンパ球検体からも同様に樹立が可能であった。

それらの未分化性に関して詳細に解析したところ、センダイウイルスによって導入された四つの外来遺伝子は、数回の継代をおこなうことで完全に消失しており、一方で*Nanog*, *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*, *Gdf3*, *Rex1*, *Dppa2*, *Dppa4*といった内在的なES細胞のマーカーがmRNAレベルで発現していることが示された。免疫染色レベルでも

*2 エピソーマルベクター

核内には入るが染色体外で遺伝子を発現するタイプのベクターであり、遺伝子は染色体には組み込まれない。アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、プラスミドDNAを用いたベクターなどがこれに含まれる。

図5 TiPS細胞のコロニー

ES細胞様の小さい細胞が集めた平坦なコロニーが得られた。これらのコロニーは、継代して増殖を続けさせることが可能であった。

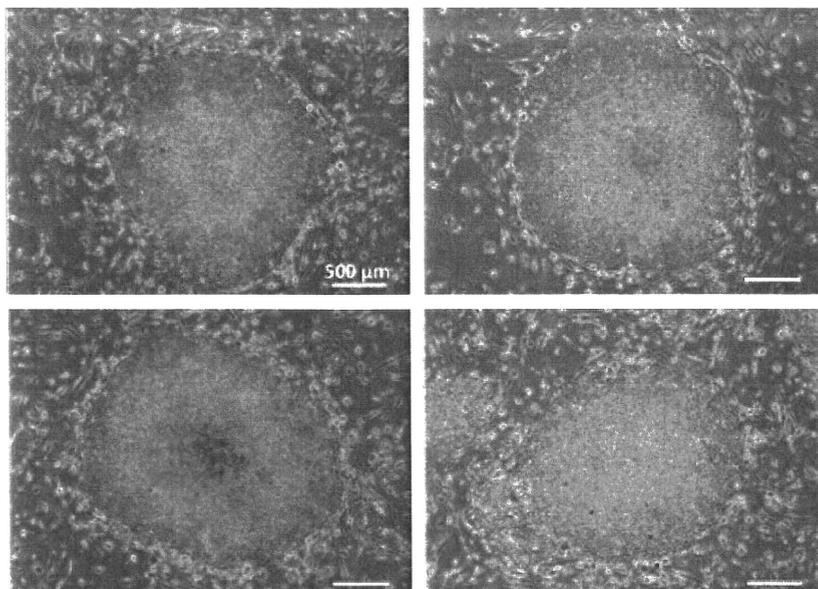


図6 TiPS細胞の免疫染色

TiPS細胞は、免疫染色によって*Nanog*, *Oct3/4*, *SSEA3*, *SSEA4*, *Tra-1-60*, *Tra-1-81*といった未分化マーカーが発現していることが確認された。

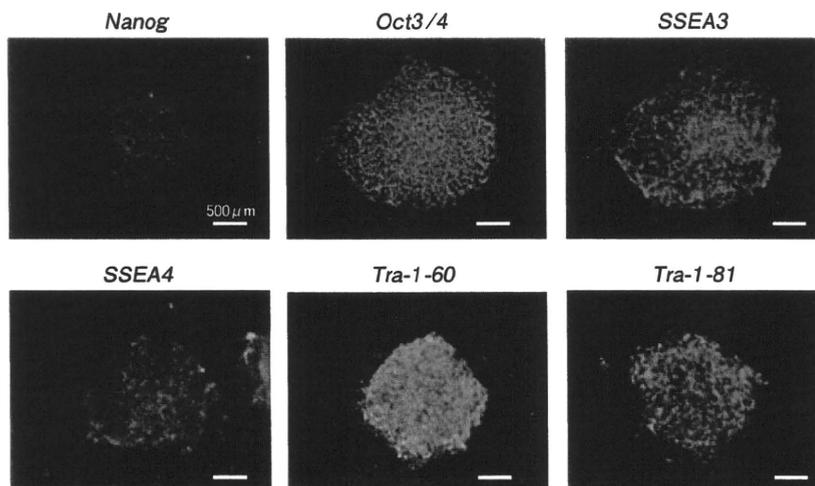
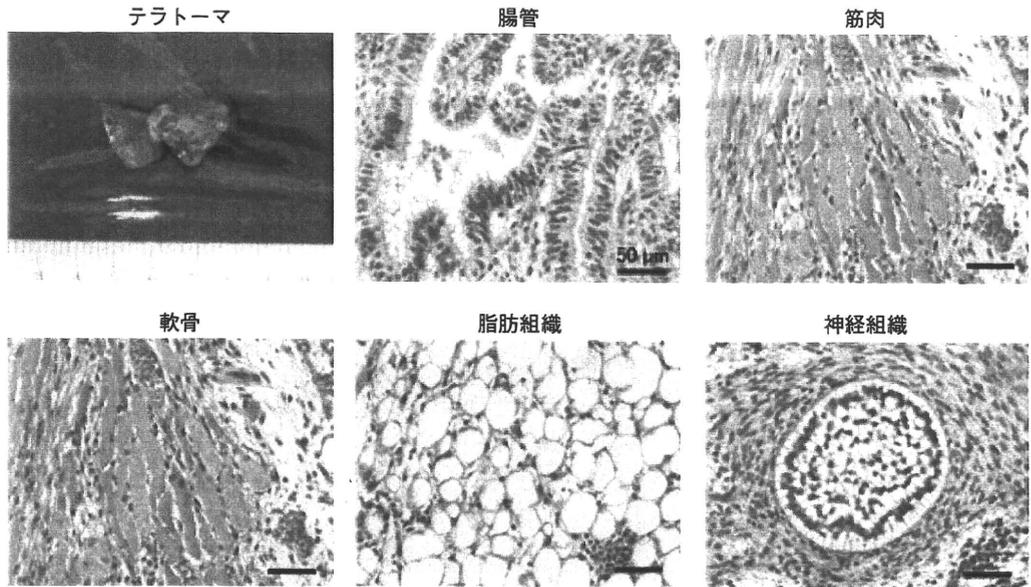


図7 TiPS細胞の三胚葉由来組織への分化

TiPS細胞を免疫不全マウスに注射すると、テラトーマ(奇形腫)が形成された。テラトーマ切片をヘマトキシリン・エオシン染色(HE染色)すると、TiPS細胞が三胚葉由来組織へ分化していることが確認された。



Nanog, *Oct3/4*, *SSEA3*, *SSEA4*, *Tra-1-60*, *Tra-1-81*といったES細胞特異的なタンパク質が作られていることが確認できた(図6)。

また、分子マーカによる確認のほか、テロメラーゼの活性も高まっていることが確認され、*Nanog*, *Oct3/4*のCpG領域^{*3}のメチル化についてもES細胞と同様のパターンを示すことが確認された。加えて、ほかの体細胞から樹立されたiPS細胞と同様に、ヒトT細胞から作られたiPS細胞もテラトーマ形成能をもっており、三胚葉由来組織に分化が可能であることが示された(図7)。すなわち、T細胞由来のiPS細胞は、ほかの体細胞由来のiPS細胞と未分化性において同等と考えられた。こうした細胞をわれわれはT細胞由来iPS細胞、すなわち

「TiPS細胞」と名づけた。

TiPS細胞の樹立効率は、感染濃度を上げるとともに上昇し、 $MOI^{*4} = 20$ という高濃度では、細胞 5×10^4 個あたりおよそ50個のES細胞様のコロニーを安定して得ることができた。これは、患者の検体から樹立することを考えたとき、十分な効率を達成していると考えられる。

また、興味深いことに、TiPS細胞では、由来となったT細胞でおこったTCR関連遺伝子の組換えパターンがそのまま維持されていた。さらに、TiPS細胞から分化した細胞にもそのパターンが引き継がれることも確認された。このため分化や細胞機能に与える影響を再確認したうえで、臨床応用する必要があると考えられる。一方、細胞株の区別に有用であるだけでなく、将来的に細胞

移植への適応を考慮した場合に必要な、細胞を追跡できるマーカーとしての可能性をもっていると考えられる。

おわりに

本技術の確立により、より簡便に患者からiPS細胞を樹立することが可能となった。T細胞は体外で簡単に培養・増幅させることができ、血液検査などで採取された血液などを利用することで患者に苦痛を与えることなくiPS細胞を樹立することができる。皮膚生検を必要としないため、女性や乳幼児などこれまでiPS細胞を樹立することが比較的困難であったケースでも容易にiPS細胞が樹立できる(図8)。

また、ゲノムに挿入されないセンダ

FOOTNOTE

*3 CpG領域

哺乳類のDNAメチル基転移酵素は5'-CG-3'のシトシン残基をメチル化する。このメチル化のターゲットとなる部分をCpG領域とよぶ。遺伝子がメチル化されると転写が抑制されることが知られており、不活性な遺伝子は高度にメチル化されている。

*4 MOI

Multiplicity of Infectionの略。細胞数に対するウイルスの比率を示す。たとえばMOI=1では1細胞に対しウイルス粒子一つの割合で存在していることを示す。

ウイルスベクターを用いることで、挿入遺伝子の再活性化の恐れがないという点も本樹立法の大きな利点である。さらにわれわれの確立したプロトコールでは、iPS細胞樹立前の検体を凍結保存した場合や常温で輸送した場合でもiPS細胞の樹立が可能であり、再生医療のソースとして有望であることはもちろん、遺伝性疾患などの疾患モデルの対象

症例の拡大が期待できると考えられる。遺伝子の再構成後の細胞でもiPS細胞が樹立できたことから、そのリプログラミングの機構を明らかにするためにも期待がもてる成果であるといえる。

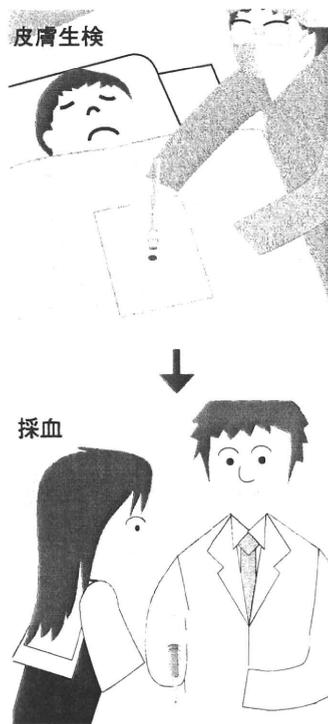
以上のことから、当研究で達成されたiPS細胞樹立方法により、今後の再生医療研究のさらなる進歩が期待されると考えられる。

謝辞

本稿に記載した筆者らの研究は、財団法人癌研究会癌化学療法センター分子生物治療研究部 清宮啓之先生、慶應義塾大学医学部生理学教室 岡田洋平先生、DNAVEC株式会社との共同研究でなされたものであり、深謝いたします。

図8 より低侵襲な細胞採取

皮膚生検は局所麻酔を要し、生検後に縫合する必要がある。一方、採血はクリニックなどでも一般的になされている手技であり、低侵襲性という点で皮膚生検より優れているといえる。



Profile

せき・ともひさ

2006年慶應義塾大学医学部卒業。2008年同大学医学部大学院医学研究科(循環器内科)入学。

ゆあさ・しんすけ

1999年慶應義塾大学医学部卒業。2005年同大学医学部大学院医学研究科(循環器内科)修了。同年より同大学医学部循環器内科助手。2008年より同大学医学部循環器内科助教。11月より総合医科学研究センター特別研究講師。

ふくだ・けいいち

1983年慶應義塾大学医学部卒業。1987年同大学医学部大学院医学研究科(循環器内科)修了。1992年アメリカ・ハーバード大学留学、1994年アメリカ・ミシガン大学留学、1995年慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科助手、1999年同大学医学部心臓病先進治療学講師、2004年同大学医学部再生医学教室教授を経て、2010年より同大学医学部循環器内科教授。

参考文献

- [1] Takahashi K & Yamanaka S: "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors" Cell 126(2006) 663-676
- [2] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M et al: "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors" Cell 131 (2007) 861-872
- [3] Aasen T et al: "Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes" Nat Biotechnol 26 (2008) 1276-1284
- [4] Loh Y H et al: "Generation of induced pluripotent stem cells from human blood" Blood 113 (2009) 5476-5479
- [5] Seki T et al: "Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells" Cell Stem Cell 7 (2010) 11-14
- [6] Hong H et al: "Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway" Nature 460 (2009) 1132-1135
- [7] Yu J et al: "Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences" Science 324 (2009) 797-801
- [8] Zhou H et al: "Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins" Cell Stem Cell 4 (2009) 381-384
- [9] Fusaki N et al: "Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome" Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 85 (2009) 348-362
- [10] Okano S et al: "Recombinant Sendai virus vectors for activated T lymphocytes" Gene Ther 10 (2003) 1381-1391

iPS細胞と心筋再生

Strategy for myocardial regeneration using induced pluripotent stem (iPS) cells

楠本 大・福田 恵一

Kusumoto dai

Fukuda keiichi

Key words

再生医療 幹細胞 ES細胞
iPS細胞 心筋再生 心筋分化

要約

様々な心疾患の終末像である末期心不全は、非常に予後が悪く、根本治療としては心臓移植しか存在しないのが現状である。しかし心臓移植にも問題点が多く、新規治療法として近年再生医療、細胞移植医療が注目を集めている。細胞移植のソースに使用される細胞は、骨格筋芽細胞、骨髄・末梢血由来細胞、体性幹細胞、胚性幹 (ES) 細胞などがある。最近では体細胞に4つの転写因子 (Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4) を導入することにより作成される誘導多能性幹 (iPS) 細胞が新たなソースとして注目を集めている。iPS細胞を心筋再生医療に用いるためには心筋の効率的な分化誘導法の開発、心筋の精製法、効率の良い移植方法の開発などが必要である。ES/iPS細胞からの心筋分化誘導法は多くの方法が開発されており、最近では顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) が心筋を増殖させることが報告された。しかし実際の臨床応用のためにはさらに多くの研究を重ねる必要がある。

はじめに

近年、我が国においても食生活の欧米化などにより生活習慣病が増加の一途をたどっている。生活習慣病をベースとして発症する心疾患も今後さらに増えることが予想される。虚血性心疾患や拡張型心筋症などにより一度心筋細胞が失われると、心筋細胞は増殖能を持たないため心機能は低下し最終的には心不全へと進行する。その終末像である末期重症心不全に陥ると予後は極めて悪いことが知られている。

る。薬物療法を中心とする内科的治療に抵抗性となり、根本的治療として心臓移植を行うしかないのが現状である。しかし心臓移植にもドナーの不足、免疫拒絶など解決すべき問題点があり、満足のいく治療法とはなっていない。近年、幹細胞生物学の発達により、このような重症心不全に対する新規治療法として再生医療、細胞移植医療が注目を集めている。本稿では最近注目を集めているiPS細胞を用いた心筋再生の試みについて、特に心筋への分化誘導法を中心に概説する。

細胞移植におけるiPS細胞の意義

心臓領域における細胞移植医療として、すでに骨髄・末梢血由来細胞、骨格筋芽細胞を用いたREPAIR-AMI, MAGIC trialなどの臨床試験が欧米で行われている。しかしながらその有効性は不十分であり、あらたな細胞ソースを検討する必要がある。利用可能な細胞ソースとしてまず考えられるのは体性幹細胞である。心筋は一度障害を受けると再生しないことから、以前は成体の心臓には体性幹細胞は存在しないとされていた。しかし近年成体心臓にも心筋への分化能力を有するc-kit陽性細胞、Sca-1陽性細胞、islet1陽性細胞、side population (SP) 細胞などの心筋前駆細胞あるいは幹細胞が存在するこ

慶應義塾大学医学部 循環器内科

M.D.Department of cardiology Keio University school of Medicine

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

とが報告されている。また心筋組織を単離する事で得られる、自律増殖を行う浮遊の細胞塊 cardiosphere 由来の細胞を心筋梗塞モデル動物に移植することで梗塞範囲が縮小する事が報告されている¹⁾。しかしこれらの体性幹細胞は増殖能が不十分であり、心機能を回復させるために必要十分な細胞数を得るためには工夫がまだ必要である。

次に多能性幹細胞の利用が考えられる。ES細胞は、初期胚である内細胞塊に由来する多能性幹細胞である。体性幹細胞に比べて増殖能や多分化能が秀でており、成体外で無限に増殖させる事や、様々な細胞に分化させる事が可能であることから有効な移植の細胞ソースとして考えられる。実際にマウスのES細胞から心筋細胞を分化誘導し、マウスの心臓に移植することでホストの心臓組織に生着することが確認されている²⁾。しかし、ES細胞は本来個体になりうる受精卵の破壊を伴う方法であるため倫理的・法的な問題や、自己由来の細胞でないために

細胞移植の際に免疫拒絶反応が惹起される問題点が指摘されていた。2006年Takahashi, Yamanakaらが皮膚由来線維芽細胞に4つの転写因子 (Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4) を導入することによりES細胞と遜色のない能力を持ったiPS細胞の開発に成功し、上記のES細胞の問題点を解決する技術として世界中の注目を集めた³⁾。iPS細胞を心筋移植医療の細胞ソースとして用いる事で、現在までに指摘されている様々な問題点を解決し、実際の臨床応用につながるのではないかという大きな期待が持たれている。

iPS細胞を用いた心筋再生戦略

iPS細胞を用いて心筋再生医療を行うことを考えた際に、以下のようなステップが必要となる(図1)。

- ①心筋再生療法の対象となる患者からiPS細胞を樹立する。
- ②iPS細胞から大量の心筋細胞の分化誘導を行う。
- ③心筋細胞を精製して純化する。
- ④精製し

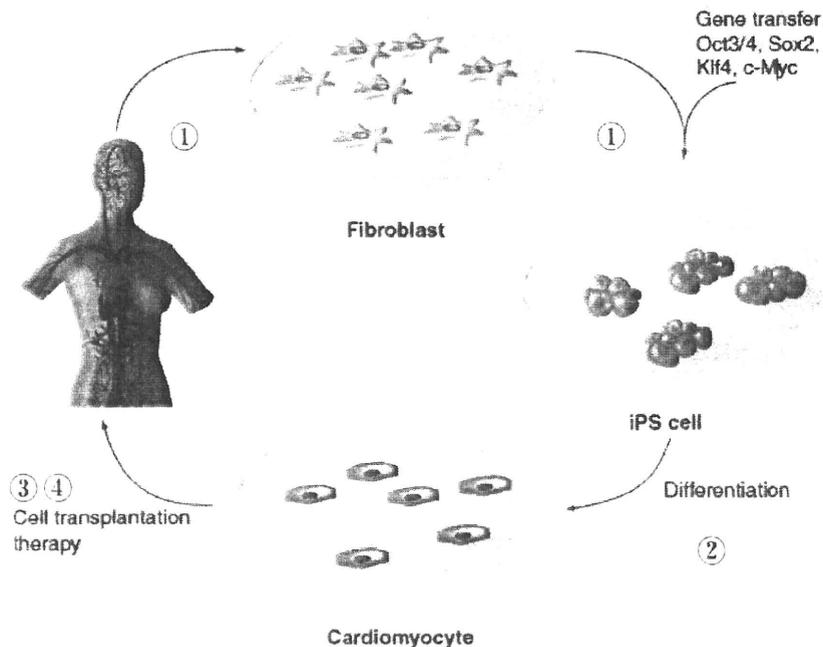


図1 iPS細胞を用いた心筋再生医療のステップ

添加された因子	報告者	文献
retinoic acid	Wobus, A.M. <i>et al.</i>	J. Mol. Cell Cardiol. 29, 1525–1539 (1997).
transforming growth factor 1	Behfar, A. <i>et al.</i>	Faseb J. 16, 1558–1566 (2002).
fibroblast growth factors	Dell'Era, P. <i>et al.</i>	Circ. Res. 93, 414–420 (2003).
dynorphin B	Ventura, C. <i>et al.</i>	Circ. Res. 92, 623–629 (2003).
ascorbic acid	Takahashi, T. <i>et al.</i>	Circulation 107, 1912–1916 (2003).
nitric oxide	Kanno, S. <i>et al.</i>	Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 12277–12281 (2004).
fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2	Kawai, T. <i>et al.</i>	Circ. J. 68, 691–702 (2004).
Wnt11	Terami, H. <i>et al.</i>	Biochem. Biophys. Res. Commun. 325, 968–975 (2004).
PP2 (a Src family kinase inhibitor)	Hakuno, D. <i>et al.</i>	J Biol Chem. 280, 39534-44. (2005).
Wnt3a / Wnt inhibitor	Naito AT. <i>et al.</i>	Proc Natl Acad Sci U S A. 103, 19812-7 (2006).
Wnt3	Ueno, S. <i>et al.</i>	Proc Natl Acad Sci U S A. 104, 9685-9690 (2007).
Wnt3	Kwon, C. <i>et al.</i>	Proc Natl Acad Sci U S A. 104, 10894-10899 (2007).

図2 過去に報告されたES細胞から心筋細胞への誘導方法

た心筋細胞を移植する。

いずれのステップも非常に重要であり、現在までに様々な技術が開発されてきた。以下において、心筋細胞の分化誘導法に焦点をあてて詳細を述べたい。

ES細胞からの心筋分化誘導

心筋細胞への分化誘導に関しては、古くからES細胞を用いた報告がされてきた。1981年にマウスES細胞が樹立され、その4年後には心筋細胞への分化能を有することが報告された。ES細胞をhanging dropなどの方法で浮遊培養することで円筒胚に酷似

した球状の胚葉体 (EB) が得られる。EBを培養し続けるとやがて自律拍動を続ける心筋細胞塊が誘導できる。2001年にはヒトES細胞でも同様の手法で心筋に分化することが明らかとなった。ES細胞から心筋誘導を行い移植の細胞ソースとして用いるためには大量の心筋細胞が必要となるため、今までに様々な効率の良い心筋分化誘導法の開発研究が行われてきた (図2)。ES細胞は初期胚に由来するため、その分化過程は正常の発生を模倣していると考えられる。すなわち心臓発生上重要である因子がES細胞からの心筋分化にも重要な役割を果たしているのではないかと考えられる。

レチノイン酸 (RA) はビタミンAの誘導体であ

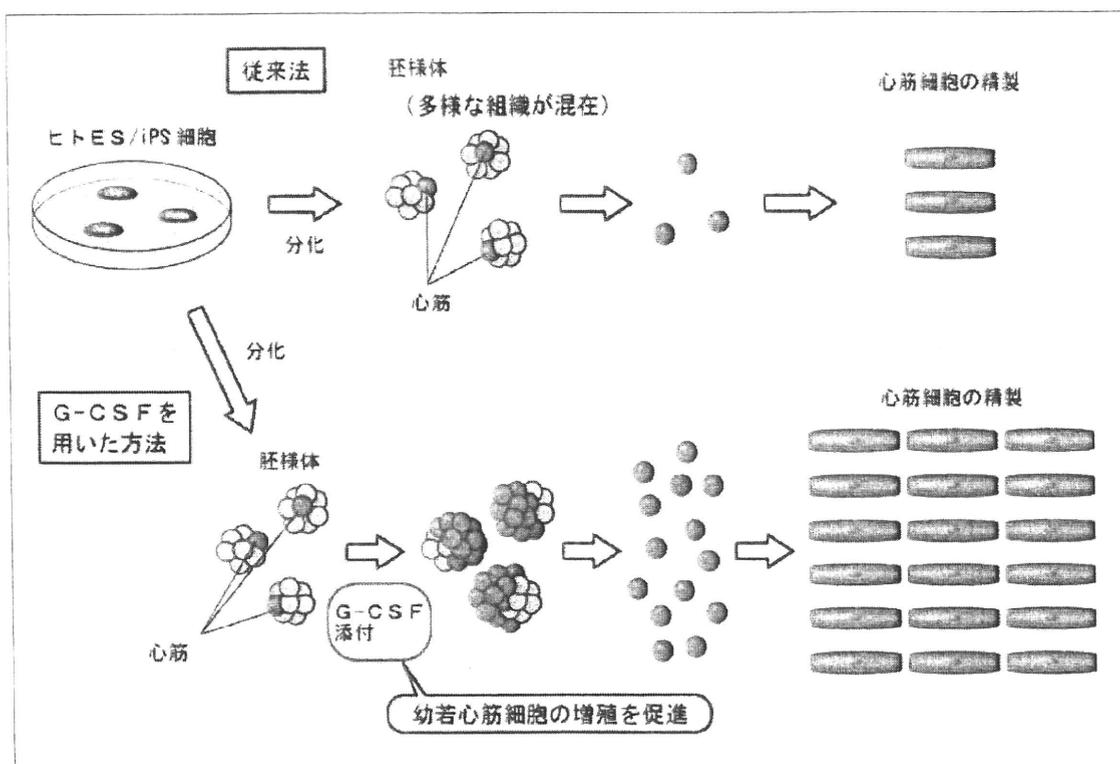


図3 G-CSFがES/iPS細胞から分化した心筋細胞の増殖を促進する

る。RA受容体の欠損マウスでは心奇形を生じ、また発生時期にビタミンAが不足すると心奇形を認めるようになることに注目し、1997年WobusらはES細胞にRAを投与することにより心筋の分化誘導効率を上げることを報告した⁷⁾。2003年Takahashiらは880種類のcompoundを用いてスクリーニングを行いascorbic acidが心筋分化を促進することを報告した⁸⁾。2005年Hakunoらは、Src family kinase inhibitorであるPP2がfaocal adhesion kinase (FAK)を抑制することで心筋分化誘導できることを報告した⁹⁾。

2005年Yuasaらは心筋細胞の運命決定がなされるマウスの胎生7.0日目周辺で、心筋細胞発生領域に発現する因子について検討を行い、BMP antagonistであるNogginが心筋発生領域に一過性に強く発現することを見出し、Nogginによる一過性のBMP抑

制が心筋の発生に重要であると考えられた。さらにES細胞から心筋細胞への分化誘導でも、分化誘導の初期にのみNogginを添加することで心筋細胞を選択的かつ効率に産生できることを報告した⁷⁾。しかし、Nogginが心筋細胞への分化誘導効率を高めている詳細なメカニズムは明らかではなかった。

2010年Shimojiらは、Nogginを添加したES細胞において顆粒球コロニー刺激因子受容体(G-CSFR)の遺伝子発現が、Nogginを添加していないものに比べ1000倍近く上昇することを発見した。マウスの発生においてもG-CSFRは心臓が発達を始める胎生8.5日目から心臓原基において発現が見られるようになり、心臓が最も増殖し成長する胎生10.5日目に発現のピークを迎え、その後減少していくことが分かった。またG-CSFRのリガンドである顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)も同様に発現が上昇して

いることを明らかにした。G-CSFR 欠損マウスの心筋細胞は、正常なもの比べて細胞分裂の頻度が低下していた。G-CSF を加えて培養を行うと、正常マウスでは心筋細胞の分裂頻度が上昇したが、G-CSFR 欠損マウスでは変化がなかった。さらにG-CSFR 欠損マウスの個体発生では約50%が胎生致死となり、これらのマウスでは心房や心室において心筋細胞の層が薄くなっており心筋細胞が正常に増殖できなくなっていた。これらの結果から、心筋細胞はその発生過程ではG-CSF を分泌し、また心筋細胞自身が発現するG-CSFR によって自らその信号を受け取り、細胞増殖を行っている可能性が示された。さらにES 細胞からの分化においてG-CSF が心筋細胞増殖へ関与しているかどうかを調べた。その結果、マウスES 細胞を心筋細胞に誘導した直後の時期にG-CSF を投与すると、心筋細胞が著しく増殖する現象が観察された。またマーマセットES 細胞を用いた実験、あるいはヒトiPS 細胞を用いた実験でも心筋へ誘導される細胞を増加させていることを示した⁸⁾。(図3)

iPS細胞からの心筋分化誘導

ヒトiPS細胞の心筋分化誘導に関しては、2009年ZhangらによりヒトiPS細胞が心房型・心室型など様々なタイプの心筋細胞に分化誘導可能であり、それらがヒト心筋細胞と同様の電氣的・組織的特性を有することが報告された⁹⁾。さらに同年、Tanakaらは同様に分化誘導したヒトiPS由来心筋細胞が各種イオンチャネルを発現し、さらに抗不整脈薬に対する応答性を有することを報告し¹⁰⁾、浮遊培養を用いたES細胞からの心筋分化誘導法がiPS細胞でも同様に応用可能であることが確認された。しかし分化効率に関してはES細胞に比して劣るといった報告もあり、今後iPS細胞をES細胞に代わる新たな細胞移植ソースとして考えた際に、さらなる効率の良い心筋細胞分化誘導法の確立が必須であると考えられる。

おわりに

以上の他にも、近年ES/iPS細胞から心筋へ効率的に分化誘導を行う様々な方法が開発されている。さらに、分化誘導した心筋細胞を純化・精製し、移植する方法についても、最近新しい報告がなされている。しかし未だにその技術は十分ではあるとは言えず、更なる研究開発が待たれている。将来的にはこれらの知見を生かし、大型実験動物における移植実験の検討を経て、iPS細胞を用いて重症心不全を治療する心筋再生医療の実現が期待される。

文 献

- 1) R. R. Smith, L. Barile, H. C. Cho *et al.*: *Circulation*: 896-908, 2007.
- 2) T. C. Doetschman, H. Eistetter, M. Katz *et al.*: *J Embryol Exp Morphol* 87: 27-45, 1985
- 3) K. Takahashi, S. Yamanaka: *Cell* 126: 663-676, 2006.
- 4) A. M. Wobus, G. Kaomei, J. Shan *et al.*: *J Mol Cell Cardiol* 29: 1525-39, 1997.
- 5) T. Takahashi, B. Lord, P. C. Schulze *et al.*: *Circulation* 107: 1912-17, 2003.
- 6) D. Hakuno, T. Takahashi, J. Lammerding *et al.*: *J Biol Chem* 280: 39534-44, 2005.
- 7) S. Yuasa, Y. Itabashi, U. Koshimizu *et al.*: *Nat Biotechnol* 23: 607-11, 2005.
- 8) K. Shimoji, S. Yuasa, T. Onizuka *et al.*: *Cell Stem Cell* 6: 227-37, 2010.
- 9) J. Zhang, G. F. Wilson, A. G. Soerens *et al.*: *Circ Res* 104: e30-41, 2009.
- 10) Tanaka T, Tohyama S, Murata M, *et al.*: *Biochem Biophys Res Commun* 385: 497-502, 2009.

<細胞ニュース>

第48回日本癌治療学会学術集会

会期：2010年10月28日(木)～30日(土)
 会場：国立京都国際会館、グランドプリンスホテル京都
 代表者：三木恒治(京都府立医科大学大学院医学研究科 教授)
 テーマ：癌を治す、癒す — Cancer Cure and Care —
 連絡先：事務局 京都府立医科大学大学院医学研究科泌尿器
 外科学内 TEL 075-251-5595 FAX 075-251-5598 HP
<http://www.congre.co.jp/jsco2010/> E-mail
jsco2010@koto.kpu-m.ac.jp

心血管領域再生医療の進歩 —成体幹細胞，ES細胞からiPS細胞へ—

湯浅 慎介，福田 恵一*

慶應義塾大学総合医科学研究センター／循環器内科講師
慶應義塾大学医学部循環器内科教授*

はじめに

末期心不全はさまざまな循環器疾患の終末像であり予後がきわめて悪く，患者さんの苦しみも非常に強い。また，末期心不全に至ると内科的治療には抵抗性を示し，根本的治療方法は心臓移植しかない。しかしながら心臓移植には多くの問題点があり，満足のいく治療法とはいえない。近年，さまざまな幹細胞を用いた再生医療の開発により，末期心不全が心臓移植以外で治療可能となるのではないかと期待されている。しかし，再生医療を一般臨床医療として実現するためには，まださまざまな壁が存在している。

幹細胞とは，「自己増殖能と多分化能を有する細胞」と定義されている。幹細胞は成体のなかでも体性幹細胞として存在し，組織の修復と維持に関与していると考えられている。成体幹細胞は自己の細胞を採取することが可能であり倫理的問題なども少なく，再生医療に早期に用いることが可能ではないかと考えられ，さまざまな基礎的検討がなされてきた。成体幹細胞を採取・分離・選別し体外で増殖・分化させ，心不

全患者に移植する細胞移植医療を確立しようとする試みが世界中でなされてきた。一方で，体性幹細胞は成体に存在する幹細胞であるが，存在する割合が低い，増殖能や分化能が低いといった多数の問題点が存在している。そこで，胎仔由来の幹細胞であるES細胞が再生医療の細胞ソースとして注目されてきた。初期胚である胚盤胞の内部細胞塊に由来するES細胞は，増殖能や多分化能が成体幹細胞に比べて非常に優れていることが知られている。1998年にヒトES細胞が樹立され，いよいよ再生医療へ応用可能になるのではないかと期待が高まってきていた¹⁾。しかしながら，ES細胞は幹細胞としての性質は非常に秀でているが，問題点としては移植医療に用いた場合には拒絶反応を防ぐために免疫抑制薬を用いる必要がある点が挙げられる。また，ヒトES細胞の樹立にはヒト初期胚を用いるために倫理的な問題もあり，樹立・使用自体にも強い制約を伴う。

しかしながら，そのような問題を打破する研究が報告された。2006年に，本邦においてマウス人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem

cell；iPS細胞)が開発されたのである²⁾。iPS細胞は，線維芽細胞にES細胞に多く発現する転写因子を導入することにより樹立される幹細胞である。iPS細胞はES細胞とほぼ同様の能力を有しており，成体の線維芽細胞から作製可能であるために自己の細胞由来の幹細胞をつくるのが可能となり，世界中に強い衝撃を与えた。翌2007年にはヒトiPS細胞の樹立が報告され，ますます臨床応用へ期待されるようになってきた³⁾。この技術を使うと，末期心不全の患者さんから線維芽細胞を採取し，遺伝子導入することにより患者さん特有のiPS細胞を樹立することが可能である。また，このiPS細胞を心筋細胞へ分化誘導することにより，若くて元気な心筋細胞が大量に得られ，それらを心不全患者さんの心臓へ移植することにより心機能が改善する可能性がある。これらは，将来の再生医療となりうると強く考えられている⁴⁾。

iPS細胞は，心筋細胞に分化しうる心筋細胞移植医療への魅力的な細胞ソースである。iPS細胞はES細胞とほぼ同等の性質を有することにより，心筋細胞分化誘導に関しては

ES細胞を用いた研究に関する知見を応用することができる。ES細胞の心筋細胞への分化能は、マウスES細胞が初めて樹立された数年後にはすでに報告されている。さらに心筋細胞分化誘導効率を高めるために、さまざまな基礎研究が行われてきた。ES細胞は初期胚に由来しており、ES細胞の分化は正常の心臓発生機構を模倣しているといわれている。正常の心臓発生機構を詳細に解明し、ES/iPS細胞から心筋細胞への分化誘導に応用することにより効率的に心筋細胞へ分化誘導しうる⁵⁾。ヒトES/iPS細胞を用いた心筋再生医療を確立するために、これまでの多くの基礎的研究が役立つと考えられる。

胚性幹細胞から心筋細胞への分化誘導

マウスES細胞樹立が報告されてから約4年後の1985年に、

DoetschmanらによりES細胞から心筋細胞が分化しうるということが報告された⁶⁾。1990年代中盤に入ると、心筋細胞への分化誘導後に細胞移植を行うことを念頭に研究が進められていくこととなった⁷⁾。2001年になると、ヒトES細胞もまた心筋細胞に分化しうるということが報告され、ES細胞由来心筋細胞を心不全モデルの心臓に移植することにより、末期心不全が治療しうる可能性があることがわかってきた。

ES細胞から心筋細胞への分化誘導方法に関する研究はさまざまなものが行われており、そのいくつかを紹介する(表1)。レチノイン酸はビタミンAの誘導体であり、レチノイン酸受容体の欠損マウスでは心奇形が認められることが古くから知られていた。また、心臓発生時期にビタミンAが不足していると心奇形を生ずることより、ビタミンAが心臓の発生に強く関与していることが予測されていた。また1980年代前半より、

初期発生のモデルとして用いられていたembryonic carcinoma(EC)細胞の分化誘導において、レチノイン酸をある特定の濃度・分化時期に投与することにより、心筋細胞が分化誘導されることが報告されていた。これらのことより、1997年にWobusらはES細胞にレチノイン酸を投与することにより心筋細胞の分化効率を上げることに成功している⁸⁾。また、彼らは心筋細胞のなかでも特に心室筋の分化誘導効率が上がると報告していることも興味深い点であるといえる。また近年、特に心筋細胞分化誘導を調節する因子として注目されているものにWntがある。Wntは20種類からなり、脂質により修飾された分泌型糖蛋白であり、さまざまな組織の発生に重要な役割を果たしている。心臓発生においても、さまざまなモデル動物を用いた検討からWntの役割が判明している。ショウジョウバエを用いた検討では、Wntが心臓発生を促進する

表1 過去に報告されたES細胞から心筋細胞への誘導方法

添加された因子	報告者	文献
レチノイン酸	Wobus AM, et al.	J Mol Cell Cardiol 29 : 1525-1539, 1997
形質転換成長因子β1	Behfar A, et al.	FASEB J 16 : 1558-1566, 2002
線維芽細胞成長因子	Dell'Era P, et al.	Circ Res 93 : 414-420, 2003
ジノルフィンB	Ventura C, et al.	Circ Res 92 : 623-629, 2003
アスコルビン酸	Takahashi T, et al.	Circulation 107 : 1912-1916, 2003
一酸化窒素	Kanno S, et al.	Proc Natl Acad Sci U S A 101 : 12277-12281, 2004
線維芽細胞成長因子2, 骨形態発生蛋白2	Kawai T, et al.	Circ J 68 : 691-702, 2004
Wnt11	Terami H, et al.	Biochem Biophys Res Commun 325 : 968-975, 2004
PP2(Srcファミリーキナーゼ阻害物質)	Hakuno D, et al.	J Biol Chem 280 : 39534-39544, 2005
Wnt3a/Wnt阻害物質	Naito AT, et al.	Proc Natl Acad Sci U S A 103 : 19812-19817, 2006
Wnt3	Ueno S, et al.	Proc Natl Acad Sci U S A 104 : 9685-9690, 2007
Wnt3	Kwon C, et al.	Proc Natl Acad Sci U S A 104 : 10894-10899, 2007
インスリン様成長因子結合蛋白(IGFBP)-4	Zhu W	Nature 454 : 345-349, 2007
シクロスポリンA	Yan P	Biochem Biophys Res Commun 379 : 115-120, 2009

ことが知られている。一方で、鳥類や両生類ではWntを抑制することで心臓発生が進むと考えられていた。Canonical Wnt signal(β -カテニンを介する経路)は、中胚葉誘導を促進することが広く知られていた¹¹⁰⁾。ES細胞を用いた検討では、Canonical Wnt signalは心臓発生のごく初期において造血系や血管発生を抑制し、心臓発生を促進するとされている¹¹⁾。また、後期のCanonical Wnt signalは心臓発生を抑制するとされている¹²⁾。近年のWntと心筋細胞発生に関する検討から、Wntの時間空間的制御の重要性が示唆されてきた。2003年、TakahashiらはFDAに認可されている15000種類の薬剤があるcompound libraryから、特異的な機能がありヒトに用いることができる880種類のcompoundを用い、ES細胞から心筋細胞の分化スクリーニングを行った。その結果、アスコルビン酸が心筋細胞分化を促進することがわかり報告された¹³⁾。

このように、世界中でさまざまな観点よりES細胞から心筋細胞を分化誘導しようとする試みがなされてきた。主には、正常発生より類推された重要な因子の応用、あるいは大規模なスクリーニングによる分化因子の探索といったことによる。しかしながら、多くの研究で分化誘導効率は満足のいくものではなかった。今後のヒトES細胞を用いた研究・臨床へ応用するためには、よりよい分化誘導方法を開発する必要があると考えられた。

BMPおよびBMPアンタゴニストによる胚性幹細胞より心筋細胞分化の調節¹⁴⁾

ES細胞に心臓発生に必要とされている因子を加えただけでは、十分な心筋細胞分化誘導効率は得られない。そこで、まず心筋細胞の発生過程を見直す必要があると考えられた。心筋細胞は、原腸陥入が始まり三胚葉が形成され始めるマウスの胎生7.0日目頃に発生し始める。心筋細胞の運命決定がなされるその付近に発現している因子が重要であることが予想されるために、心筋細胞発生領域に発現する因子を各種検討することとした。

骨形態発生蛋白(bone morphogenetic protein; BMP)は心筋細胞の発生において重要な因子であるが、BMPをES細胞に作用させても常に心筋細胞の分化を促進するわけではないことが判明した。さらにBMPの投与時期によっては、むしろ心筋細胞分化は低下する傾向にあった。そこから、BMP signalは発生初期において、心筋細胞の発生においては不利に働いている可能性があるのではないかと予想した。ES細胞から心筋細胞へ分化誘導するために種々の検討を重ねた結果、分化誘導の初期においてのみ培養液中にBMPアンタゴニストを添加することにより心筋細胞が高率に分化誘導されることを見出した。このことより、ES細胞からの心筋細胞分化においてBMPが常に促進的に作用させているわけではなく、心筋細胞分化のごく初期にはBMPをブロッ

クすることが必要であり、その後はこれまでの報告通りBMPが心臓発生を促進させることがわかった。このように、過去の報告と逆説的な解釈・応用が必要となる生命現象があり、ヒトES/iPS細胞の臨床応用に向けて基礎研究に取り組んでいく必要が示唆される。

G-CSFの心筋細胞増殖効果

ヒトを含む哺乳類の心筋細胞は、生直後に自己増殖能を失うことが古くから知られている。そのため、生後のさまざまな生理的要求に対して心筋細胞が増えることによって応じることができず、生理的肥大によって成長などに伴う負荷の増大に対応していくとされている。しかしながら近年の基礎的研究より、大人的心筋細胞も自己増殖能を有し、生理的なターンオーバーとして、あるいは病的負荷に応じることができると徐々に分かってきた^{15), 16)}。しかしながら、その自己増殖能は非常に限られたもので心筋梗塞を再生して治すといったことは不可能であり、また人為的に制御することもできていない。すなわち、末期心不全に至った際などに心筋細胞を増やして病気を治すということは、現在はまだ不可能である。

しかしながら、胎生期の心筋細胞というのは盛んに細胞分裂を行い臓器としての心臓を徐々に構築している。また、ES細胞由来の心筋細胞は胎児期の心筋細胞としての性質を有しているものが多く認められる。このことより、ES細胞由来

心筋細胞はいまだ増殖能を有しており、長期間培養することにより徐々に成熟心筋細胞へと表現形を変えていくことが予測される。すなわち、ES細胞から心筋細胞へと分化誘導した場合に、早期に得られる心筋細胞は未熟な心筋細胞であり増殖能を有していると考えられ、この時期に心筋細胞の増殖刺激因子を与えることができれば、より多くの心筋細胞が得られると考えられた。このことより、前述のBMPアンタゴニストを用いたES細胞から心筋細胞分化誘導系を用いて、DNA chipによる

心筋細胞増殖因子の網羅的遺伝子検索を行った¹⁷⁾。

その結果、心筋細胞分化誘導群で特異的に顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor ; G-CSF) 受容体の発現が亢進していることが認められた(図1 A, B)¹⁸⁾。実際にマウス胎子を用いて解析してみると、G-CSF受容体は胎生9.5~12.5日周辺に一過性に心筋細胞で発現していることが判明した。G-CSFが胎生期心筋細胞においてどのような機能があるかを検討するために、妊娠マウスの子宮に直

接G-CSFを注射し数日後の胎仔心臓を解析した。その結果、G-CSF投与群において心筋細胞層が厚くなり、BrdUの取り込みやphospho-Histone H3の発現を強く認めたことから、G-CSFは胎仔心筋細胞において強い増殖活性があることが判明した。また、ES細胞由来心筋細胞においてもG-CSF受容体は一過性に発現しており、G-CSFを培養液中に添加すると心筋細胞に対して強い増殖活性を有し、結果として得られる心筋細胞が著明に増加することが判明した。これらのことより、G-CSFは

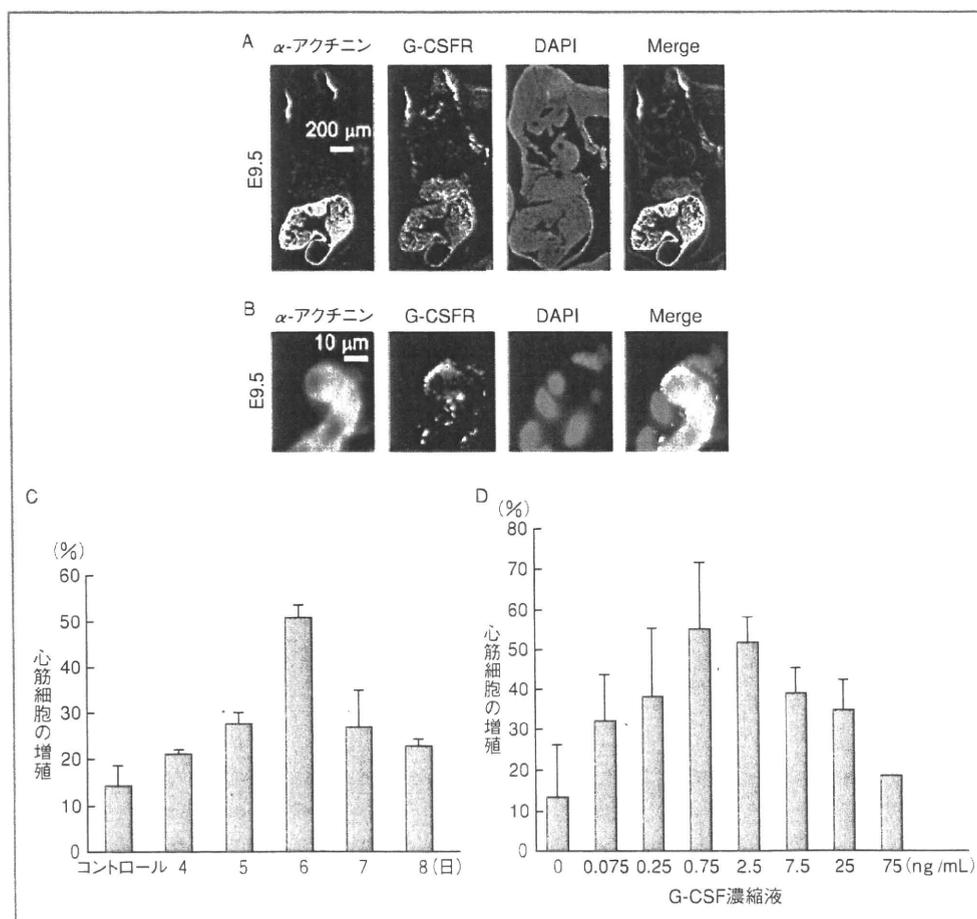


図1 心筋細胞におけるG-CSF受容体の発現と心筋細胞の増殖活性作用(カラー写真p.8参照)

増殖能を有する未熟な心筋細胞に対して強い増殖活性を示すことが示唆された(図1C, D)。これまで、G-CSFという好中球を増やす薬剤として考えられてきたが、胎仔期心筋細胞においてはその受容体を強く発現しており、心筋細胞増殖を強く活性する因子であることが判明した。また、これらの知見はヒトiPS細胞に関しても応用可能であり、ヒトiPS細胞由来心筋細胞に対しても強い増殖活性を有することも判明した。今後、心臓疾患に対するヒトES/iPS細胞研究に貢献していくことが予想される。

iPS細胞からの心筋細胞分化

iPS細胞は患者自身から作製可能なES細胞と同様の性質を示す幹細胞であり、さまざまな可能性を秘めている。2006年にマウスiPS細胞の発明後、まもなく相次いでマウスiPS細胞から心筋細胞への分化とマウスiPS細胞由来心筋細胞の解析が報告された¹⁹⁾。これらの報告によると、それまでのさまざまな報告と同様に心筋細胞に関してもマウスES細胞と同様の分化能を示していることが判明した。ヒトiPS細胞に関しても、ヒトES細胞と同様に心筋細胞に分化可能であることが示されている^{20) 21)}。

おわりに

循環器疾患における幹細胞を用いた再生医療では、これまで間葉系幹細胞、血管内皮前駆細胞、骨格筋幹

細胞、心筋幹細胞などの成体幹細胞が主役であった。しかしながら、ヒトiPS細胞の樹立に伴い循環器再生医療の主役はiPS細胞に変わりつつある。これまでも、圧倒的な自己増殖能と多分化能を有するES細胞は再生医療を担うと期待されていたが、自己の細胞でないことと倫理的問題から中心的存在にはなりえていなかった。iPS細胞はES細胞とほぼ同等の性質を有しており、これまでのES細胞を用いた基礎研究をそのまま応用することができる。心筋再生医療を実現するためにiPS細胞から安定的に心筋細胞を分化誘導する必要があり、そのためにはこれまでのES細胞を用いた研究が有用である。また、ES細胞は初期発生に準じた分化様式を呈するため、効率的な分化誘導には発生学的な知見が有用である。これらの知見をもとに、さらなる改善が期待される。今後は、さらなる心筋細胞分化誘導効率の上昇を目指し、ES細胞およびiPS細胞を用いたより安定した高率心筋細胞分化誘導方法を確立していく必要がある。このことにより心筋細胞を工場のように生み出し細胞移植・再生医療の開発へつなげられると思われる。

文 献

- 1) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al : Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282** : 1145-1147, 1998
- 2) Takahashi K, Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126** : 663-676, 2006
- 3) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131** : 861-872, 2007
- 4) Yuasa S, Fukuda K : Recent advances in cardiovascular regenerative medicine ; the induced pluripotent stem cell era. *Expert Rev Cardiovasc Ther* **6** : 803-810, 2008
- 5) Fukuda K, Yuasa S : Stem cells as a source of regenerative cardiomyocytes. *Circ Res* **98** : 1002-1013, 2006
- 6) Doetschman TC, Eistetter II, Katz M, et al : The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines ; formation of visceral yolk sac blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* **87** : 27-45, 1985
- 7) Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, et al : Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* **98** : 216-224, 1996
- 8) Wobus AM, Kaomei G, Shan J, et al : Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* **29** : 1525-1539, 1997
- 9) Yamaguchi TP, Takada S, Yoshikawa Y, et al : T(Brachyury) is a direct target of Wnt3a during paraxial mesoderm specification. *Genes Dev* **13** : 3185-3190, 1999
- 10) Arnold SJ, Stappert J, Bauer A, et al : Brachyury is a target gene of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Mech Dev* **91** : 249-258, 2000
- 11) Naito AT, Shiojima I, Akazawa H, et al : Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/ β -catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** : 19812-19817, 2006

- 12) Ueno S, Weidinger G, Osugi T, et al : Biphasic role for Wnt/beta-catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** : 9685-9690, 2007
- 13) Takahashi T, Lord B, Schulze PC, et al : Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *Circulation* **107** : 1912-1916, 2003
- 14) Yuasa S, Itabashi Y, Koshimizu U, et al : Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **23** : 607-611, 2005
- 15) Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, et al : Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* **344** : 1750-1757, 2001
- 16) Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al : Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* **324** : 98-102, 2009
- 17) Yuasa S, Onizuka T, Shimoji K, et al : Zc1 is an essential transcription factor for cardiac morphogenesis. *Circ Res* **106** : 1083-1091, 2010
- 18) Shimoji K, Yuasa S, Onizuka T, et al : G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes *in vivo* and in derivation from ESCs and iPSCs. *Cell Stem Cell* **6** : 227-237, 2010
- 19) Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, et al : Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation* **118** : 498-506, 2008
- 20) Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, et al : Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res* **104** : e30-41, 2009
- 21) Tanaka T, Tohyama S, Murata M, et al : *In vitro* pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **385** : 497-502, 2009

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の医薬品開発への応用

福田 恵一*

Application of Human iPS Cell-derived Cardiomyocyte Drug Discovery

Keiichi FUKUDA*

1. はじめに

iPS 細胞は京都大学の山中教授が開発したもの^{1,2)}で、線維芽細胞に4つのリプログラム遺伝子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) を導入することにより作製した『ES 細胞と同等の機能を持つ多能性幹細胞』である。近年、多種類のヒト細胞からの iPS 細胞樹立が報告され、注目を集めている。循環器領域でも、ヒト iPS 細胞から心筋細胞が分化誘導できることが報告されて以来、再生医療・心臓病の病態解明・創薬ツールとして多くの期待を集めている。

本稿では、iPS 細胞を用いた心筋細胞による心臓病の病態解明・創薬への応用に関する研究の状況を報告する。

2. 血液 1 滴から確実に iPS 細胞を創る技術の開発

従来の iPS 細胞樹立方法は、レトロウイルスを用いて4遺伝子を線維芽細胞に導入する方法であった。この方法は、①皮膚のバイオプシーが必要、②線維芽細胞樹立に時間が掛かる、③染色体上の既存遺伝子の破壊、④残存したリプログラム遺伝子の再活性化により腫瘍形成の可能性があること等が問題であった。

そこで、われわれは皮膚バイオプシーや線維芽細胞の樹立を必要とせず、染色体に遺伝子を挿入しない iPS 細胞を樹立する方法を開発した。この方法は、1 滴の血液 (0.1 mL) から、わずか1か月足らずで、ゲノム遺伝子を傷つけずに iPS 細胞を樹立する方法である³⁾ (Fig. 1)。わ

れわれは末梢血 T リンパ球を抗 CD3 抗体と IL2 により刺激して細胞増殖させ、これにセンダイウイルス SeV を用いて4つのリプログラム遺伝子の導入を行った。SeV は RNA (-) 鎖型ウイルスで、細胞質内で増殖するため、ゲノム遺伝子の破壊やこれらの再活性化に伴う腫瘍化の可能性を大きく低下させた。この方法で樹立した iPS 細胞は、*in vitro* でも心筋を含む3胚葉系に分化し、ゲノム染色体形に異常がなく、免疫不全マウスに移植すると奇形腫を形成し、多分化能を有することを証明した³⁾。更に、この方法によれば採血から iPS 細胞の樹立には25日しか掛からない。iPS 細胞樹立の残された課題をほぼ解決できたことになり、臨床応用に向けた大きなステップとなった。

3. iPS 細胞から心筋細胞を創る

iPS 細胞を心筋細胞に効率的に分化誘導するには、心筋分化の発生過程を出来るだけ忠実に再現することが近道である。われわれは、発生段階の心臓予定領域に発現する細胞増殖因子やその受容体を同定し、これを ES・iPS 細胞に応用することにより心筋細胞を誘導することを試みた。

われわれは心臓形成最早期の心筋前駆細胞に発現する因子をスクリーニングする過程で、BMP (Bone morphogenetic protein) の内因性阻害因子 noggin が同部位に一過性に強発現する現象を見出した⁴⁾。この noggin をマウス ES 細胞に投与し心筋細胞が誘導されるか否かを検討

* 慶應義塾大学医学部循環器内科 東京都新宿区信濃町 35 (〒160-8582)

Department of Cardiology, Keio University, School of Medicine, 35, Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

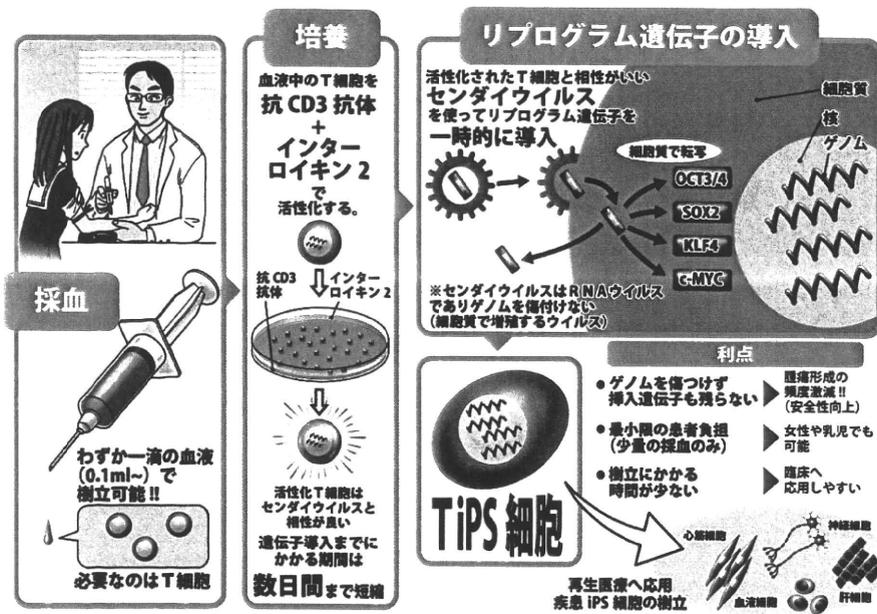


Fig.1 Tリンパ球からのiPS細胞の樹立とその特徴
末梢血中のTリンパ球を用いることにより、非侵襲的(女性、小児でも可能)にわずか25日でiPS細胞を樹立できるようになった(文献3)より改変。

胎生早期の心臓予定領域におけるNogginの発現(A)と
Noggin刺激によるES細胞の心筋細胞誘導(B)

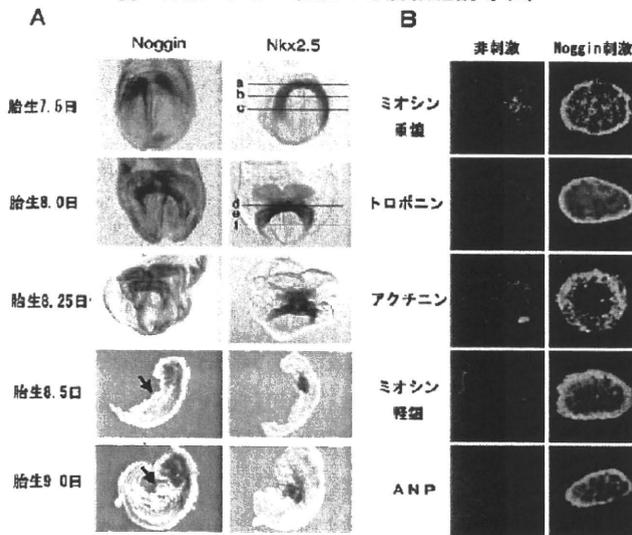


Fig.2 胎生早期の心臓予定領域に noggin は発現し、ES・iPS 細胞の心筋細胞誘導を行う

A: 発生段階における noggin の発現。心臓予定領域に極早期に短時間発現する。B: noggin により誘導した心筋細胞(緑色部分)。胚様体全体が心筋細胞に変化していることがわかる(文献4)より改変。

した結果、ある特定の時期、特定の濃度で投与するとマウス ES 細胞の 90%程度が心筋細胞に分化誘導された^{4,5)}。この現象は、ES 細胞を前方側板中胚葉に分化誘導することにより心筋誘導したものであった(Fig. 2)。この方法をサル ES 細胞⁶⁾、ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞に応用

することにより心筋細胞を誘導できたが、その一方で noggin 単独では、マウス ES 細胞に対する作用ほど効率的なものではなかった。このため、更なる細胞増殖因子のスクリーニングを行った。

4. 心筋細胞の細胞分裂により大量に心筋細胞を創る

心筋細胞は胎児期には盛んに細胞分裂するが、出生後に細胞分裂は終息する。ES・iPS 細胞から分化誘導された心筋細胞は胎仔期心筋に相当するため、まだ細胞分裂能を有している。われわれは、この時期の心筋細胞の細胞増殖を誘導する因子の同定を行った。

胎生 9・10 日目のマウス胎仔期心筋に、サイトカインの G-CSF とその受容体が発現しているのを見出した⁷⁾。妊娠 9 日目のマウス子宮内に直接 G-CSF を投与すると、胎仔心筋は盛んに細胞分裂し、心筋層の肥厚を認めた (Fig. 3)。この現象を応用し、ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞に投与した結果、これらの細胞を効率的に細胞増殖させ、心筋細胞の収量を大幅に増加させることに成功した⁷⁾。

5. ヒト再生心筋細胞を用いた電気生理学的解析

これまで、ヒト心筋細胞の電気生理学的解析はパイオプシー標本を除いて、困難であった。われわれは、iPS 細胞由来心筋細胞を用いてこれらの活動電位を記録した。通常、活動電位はガラス微小電極を用いて観察されるが、長期間の観察を可能にするため、多電極法による field potential を記録した。

その結果、心筋細胞の Na 電流、K 電流、Ca 電流を明確に分離して記録が可能となった。これらに対し、各電流の阻害薬を利用すると各電流を選択的に抑制することが可能であった (Fig. 4)。これらの方法を用いることにより、心筋の各イオンチャンネルに作用する種々の薬剤の作用を明確に分離できることが明らかとなった⁸⁾。

6. 疾患 iPS 細胞による心臓病の病態解明

iPS 細胞の最大の利点として、QT 延長症候群等の遺伝性心疾患患者の細胞を採取して、疾患モデル細胞を作出出来る点が挙げられる。心筋疾患では遺伝性 QT 延長症候群、肥大型心筋症、一部の拡張型心筋症等の遺伝子異常を伴う疾患が知られている。これらの症例から iPS 細胞を樹立し、心筋細胞に誘導することにより、これらの疾患の病態解明、治療法の開発に繋げることが出来る。われわれは既に、遺伝性 QT 延長症候群の 1 型から 3 型に関し、疾患 iPS 細胞を樹立することに成功し、現在、その電気生理学的解析を行っているところである。

7. おわりに

iPS 細胞の出現は再生医学の具現化だけでなく、種々の疾患の病態解明、創薬への応用に大きく貢献する可能

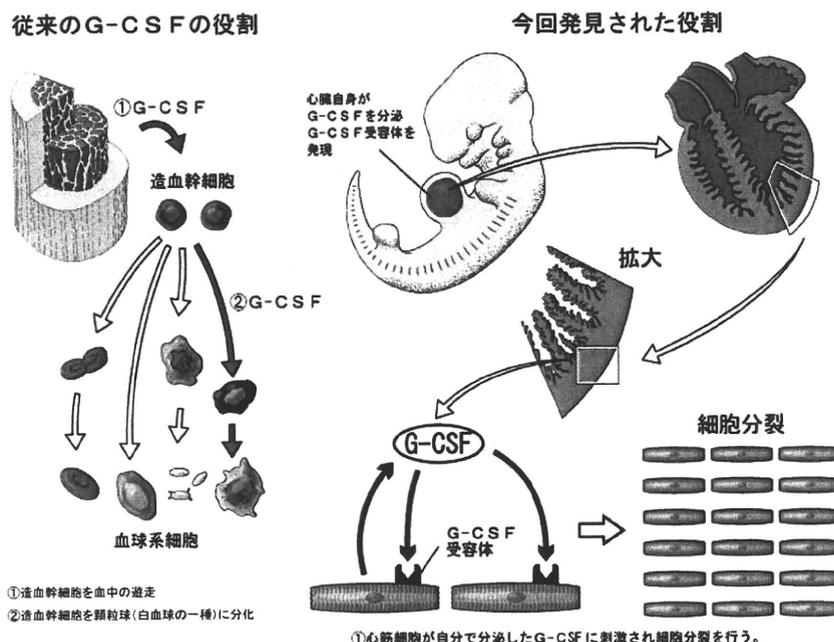


Fig. 3 G-CSF/G-CSF 受容体は autocrine 作用により胎仔期心筋の細胞増殖を行う
従来の考えではサイトカインの G-CSF は血液系に作用し、造血幹細胞の末梢血中への流出や顆粒球への移動が主たる作用であると考えられてきた。今回のわれわれの研究では G-CSF 及び G-CSF 受容体は胎仔期には心筋に最も多量に発現し、心筋細胞の増殖を司っていることが明らかとなった。これを再生医学に応用し、幼若な心筋細胞を細胞増殖させ収量を増加させることが出来るようになった (文献 7) より改変)。

ヒトiPS心筋細胞の電気生理学的解析

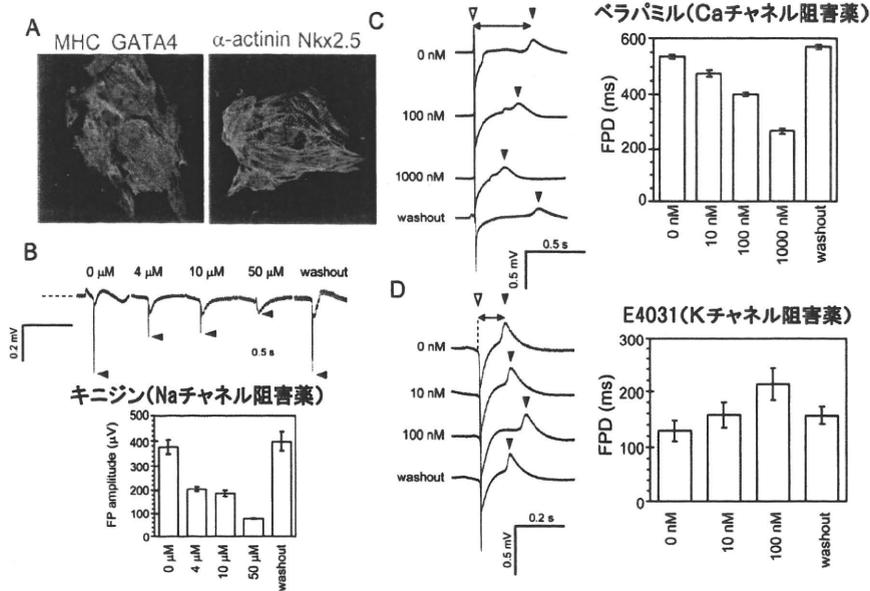


Fig. 4 ヒト再生心筋の活動電位と各種薬剤による変化

ヒト iPS 細胞を心筋細胞に分化誘導し、この再生心筋を多電極解析装置上で field potential を測定した。この field potential に対し、各々 Na 電流遮断薬 (キニジン)、Ca 電流遮断薬 (ペラパミル)、K 電流遮断薬 (E4031) を投与し、記録を行った (文献 8) より改変。

性を秘めている。本領域の研究が進み、治療を待つ患者さんに一日も早く恩恵を届けられるよう、われわれを含めた多くの研究者のより一層の努力が求められている。

文 献

- 1) Takahashi, K., Yamanaka, S.: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, **126**, 663-676 (2006).
- 2) Takahashi, K. et al.: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, **131**, 861-872 (2007).
- 3) Seki T., Yuasa S., Mayumi Oda., Egashira T., Yae K., Kusumoto D., Nakata H., Tohyama S., Hashimoto H., Kodaira M., Okada Y., Seimiya H., Fusaki N., Hasegawa M., Fukuda K.: Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell*, **7**, 11-4 (2010).
- 4) Yuasa S., Itabashi Y., Koshimizu U., Tanaka T., Sugimura K., Kinoshita M., Hattori F., Fukami S., Shimazaki T., Ogawa S., Okano H., Fukuda K.: Transient and strong inhibition of BMP signals by Noggin induces

cardiomyocyte differentiation in murine embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, **23**, 607-611 (2005).

- 5) Yuasa S., Fukuda K.: The multiple roles of BMP signaling in cardiac development. *Drug Discovery Today*, **5**, 209-214 (2008).
- 6) Chen H., Hattori F., Murata M., Weizhen Li., Yuasa S., Onitsuka T., Shimoji K., Ohno Y., Sasaki E., Hakuno D., Sano M., Makino S., Ogawa S., Fukuda K.: Common marmoset embryonic stem cell can differentiate into Cardiomyocytes. *Biophys. Biochem. Res. Comm.*, **369**, 801-806 (2008).
- 7) Shimoji K., Yuasa Y., Onizuka T., Hattori F., Tanaka T., Hara M., Ohno Y., Chen H., Koshimizu U., Ogawa S., Fukuda K.: G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes in vivo and in derivation from ES and iPS cells. *Cell Stem Cell*, **6**, 227-237 (2010).
- 8) Tanaka T., Tohyama S., Murata M., Nomura F., Kaneko T., Chen H., Hattori F., Egashira T., Seki T., Ohno Y., Koshimizu U., Yuasa S., Ogawa S., Yamanaka Y., Yasuda K., Fukuda K.: *In vitro* pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **385**, 497-502 (2009).