

部分的初期化による組織幹(前駆)細胞の作製

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科
原爆後障害研究施設 幹細胞生物学
李 桃生

1. 研究背景と目的

iPS 細胞は多分化能を有しており、様々な臓器再生に応用することが可能である^{参考文献1}。しかし、iPS 細胞の作製から実際の臓器再生治療への応用までには、以下のように3つのステップが必要と考えられる。まず、患者由来の細胞から完全な初期化(Full Reprogramming)により iPS 細胞を作製する。次に、作製した iPS 細胞を特定の臓器と疾患(心臓病)に応じて、臓器特異的な細胞(心筋細胞)へ分化誘導する。最後に、その分化誘導された細胞を分離・純化して患者に投与するといった流れである。一方、臓器特異的な体性幹(前駆)細胞は ES 細胞や iPS 細胞のように多分化能をもたず、該当臓器の細胞にのみ限定的に分化する。そのため、分化誘導・分離純化の必要なしにそのまま臓器に移植しても畸形腫形成の危険性はなく、既に世界中で臨床応用が進んでいる。しかし、患者本人から採取できる幹細胞の数が少量に限られるため、治療効果は必ずしも十分とは言えない。

個々の患者にとって再生治療に必要な臓器は限定されている。もし仮に、患者の疾患に応じて再生に必要な臓器への限定的な分化能を有する特異的な幹(前駆)細胞が作製できれば、その臓器特異的な幹細胞は、該当臓器の細胞にしか分化しないため、そのまま臓器に移植しても奇形腫などの異組織が形成しない。つまり、iPS 細胞のように分化誘導や分離純化の操作を行わずに、そのまま再生治療に利用できる可能性が考えられる。臨床応用を考えた上では、時間・経費の面で効率的であり、高い安全性が得られることも期待できる。

本研究では、患者由来の細胞を部分的な初期化(Partial Reprogramming)によって再生に必要な臓器(心臓)に特異的な幹細胞(心臓幹細胞)を作製できるか否か、また、作製した心臓幹細胞がそのまま心筋再生治療へ応用できるか否かを検証する。

2. 方法

1) ヒト心臓および皮膚生検組織から心臓幹細胞の作製

心臓および皮膚生検組織から心臓組織由来細胞および皮膚由来線維芽細胞を培養増殖し^{参考文献2}、以下の遺伝子を導入して、心臓幹細胞の作製を試みた。

- ア：心臓幹細胞に多く発現している遺伝子(Isl-1、c-kit、Sca-1 など)
- イ：心筋細胞の早期形成に必要な遺伝子(Nkx2.5、GATA-4、MEF-2c など)
- ウ：内皮細胞の早期形成に必要な遺伝子(Flk-1、Flk-4 など)
- エ：その他の遺伝子(Tbx5、Sox2、Oct3/4 など)

2) 作製した心臓幹細胞の特性の検証

以下の方法で心臓幹細胞の特性の有無を確認した。

- ア：心筋細胞、平滑筋細胞、及び内皮細胞への分化効率。
- イ：多分化能に関連する遺伝子の発現。
- ウ：他臓器(肝臓、脂肪、骨・軟骨、神経など)細胞への分化。

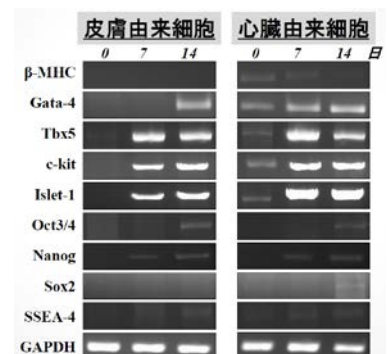
3. 結果

心臓組織由来細胞および皮膚由来線維芽細胞に導入する遺伝子の種々の組み合わせにより、心臓幹細胞の作製を試みた。そして、二つの遺伝子(注*)の導入により、以下の結果が得られた。

(注*：特許を絡んでいるため、現段階でこの遺伝子の詳細名称は公表できない)

1) 心臓幹細胞の作製効率と遺伝子発現パターンの変化

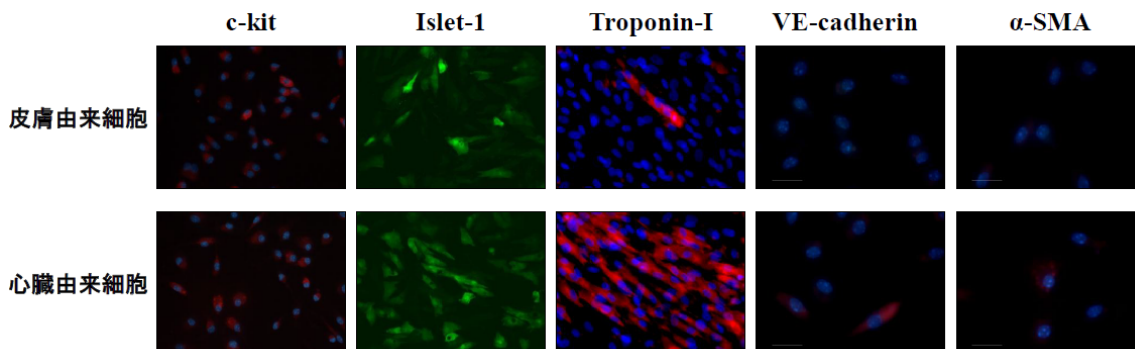
心臓組織由来細胞および皮膚由来細胞に、それぞれ二つの遺伝子の導入により遺伝子の経時的発現変化を右図に(図1)に示す。二つの遺伝子導入後7、14日目にGata4、Tbx5、c-kit、Islet-1など心臓幹細胞関連遺伝子の発現が認められる一方で、Oct3/4、Nanog、Sox2、SSEA-4など多能性幹細胞関連因子の発現があまり認められないため、心臓幹細胞の特性を有するものと思われる。



2) 遺伝子導入の作製した細胞の特性と心筋、内皮、平滑筋細胞への分化

心臓組織由来細胞および皮膚由来細胞に、それぞれ二つの遺伝子を導入後4週目に、免疫染色でその特性を調べた。心筋幹細胞の同定に良く使われるマーカーc-kitとIslet-1の発現がそれぞれ約30～60%の陽性率で認められた(下図)。

また、遺伝子を導入後4週目の細胞に、それぞれ心筋、内皮、平滑筋細胞への分化誘導を行い、分化誘導5日後に免疫染色でその分化機能を調べた。遺伝子を導入した心臓組織由来の細胞から効率よく心筋細胞(Troponin-I陽性)へ分化したが、同じ遺伝子導入した皮膚由来細胞では心筋細胞への分化効率が明らかに低かった。また、遺伝子を導入した心臓組織由来の細胞から約10%の効率で内皮細胞(VE-cadherin陽性)や平滑筋細胞(α -SMA陽性)への分化は認められたが、同じ遺伝子導入した皮膚由来細胞では内皮細胞や平滑筋細胞への分化効率が極めて低かった(<2%)。



一方、上記の二つの遺伝子を導入した心臓および皮膚組織由来の細胞から脂肪、軟骨、神経などへの分化は免疫染色法で観察されなかった。

4. 考察

患者皮膚由来線維芽細胞および心筋組織由来細胞に二つの因子を導入することにより、それぞれ心筋幹細胞関連遺伝子の発現が誘導された。また、この二つの因子を導入した細胞には多能性幹細胞関連因子の発現がほとんど認められなかったため、完全に未熟な幹細胞の誘導よりも、組織幹(前駆)細胞の特性を有するものと思われる。さらに、この二つの因子を導入した細胞は心筋細胞、内皮細胞、および平滑筋細胞への分化は認められたが、脂肪、軟骨、神経など多臓器の細胞への分化は観察されなかったため、心筋幹細胞の特性を有するものと思われる。

本研究ではドナー細胞として心筋組織由来細胞と皮膚由来線維芽細胞を用いた。心筋組織由来細胞と比べ、皮膚由来線維芽細胞への遺伝子導入は、心筋幹細胞様細胞の作製効率(c-kitやIslet-1陽性率)、および心筋、内皮、平滑筋細胞への分化効率が低かった。その理由は不明であるが、iPS細胞の作製で見られる“somatic memory”現象と類似しているものと思われる^{参考文献3}。

我々は二つの遺伝子導入により心筋組織由来細胞の作製にほぼ成功していると認識している。しかし、前記したように、ドナー細胞の組織由来によって心筋幹細胞様細胞の作製効率や作製した細胞の性質が異なることが認められた。また、同じ患者の心臓組織由来のドナー細胞であっても、使用する細胞の継代回数の違いによって心筋組織由来細胞の作製効率が異なることも認められた。以上のことから、作製技術の安定化にはさらなる努力が求められる。

現在、この二つの遺伝子の導入により作製した心筋幹細胞様細胞は、最長8週間の継代培養しか行われていなかったため、長期培養による細胞特性の維持を確認することが重要と思われる。さらに、本法で作製した心筋幹細胞様細胞は*in vivo*実験モデルでの心筋再生効果と安全性の検証も今後の課題である。

5. 参考文献

1. Robinton DA, et al. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*. 2012;481:295-305.
2. Li TS, et al. Cardiospheres recapitulate a niche-like microenvironment rich in stemness and cell-matrix interactions, rationalizing their enhanced functional potency for myocardial repair. *Stem Cells*. 2010;28:2088-98.
3. Kim K, et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2010;467:285-90.