

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10222

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞を用いたファロー四徴症発生分化異常の解明

研究課題名(英文) New approach in mechanisms of Tetralogy of Fallot with human iPS cells.

研究代表者

鈴木 孝明 (Suzuki, Takaaki)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：10196834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ファロー四徴症(TOF)患者手術により摘出される胸腺組織より線維芽細胞を分別培養し、それを用いてiPS細胞誘導を試みた。何種類かの誘導法を用いて施行したが、誘導効率はどれも高く、十分量のiPS細胞コロニーの形成を確認した。山中4因子OSKM(Oct3/4, SOX2, Klf4, L-Myc)以外にも、Jarid2, Prdm14, Sall4a, Essrb1も組み合わせて導入を行ったが、有意な差異は認めなかった。得られたiPS細胞を用いて心筋細胞群誘導も施行したが、高効率に心筋細胞群に誘導された。得られた心筋細胞群にTOF特異的な遺伝子変異等の異常は現在までのところ見つかっていない。

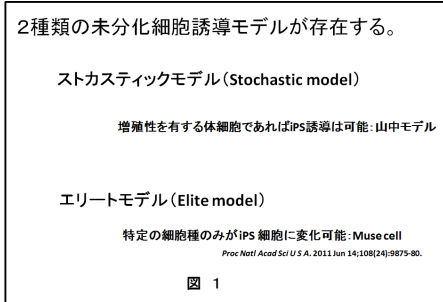
研究成果の概要(英文)：Using the thymus as remainder tissue after the surgery of Tetralogy of Fallot (TOF), fractional culture of fibroblasts was performed. The fibroblasts from the thymus had high potential to create human iPS cells (hiPSc) by various methods. Although Jarid2, Prdm14, Sall4a and Essrb1, which also have potential power to induce hiPSc, were used combined with OSKM that is the Yamanaka factors, there was no significant difference among them. Using this hiPSc, the cardiomyocytes differentiation was performed. The thymus derived fibroblasts had highly potential to develop the cardiomyocytes, however, at this time, it is still covered difference between TOF and normal.

研究分野：先天性心疾患

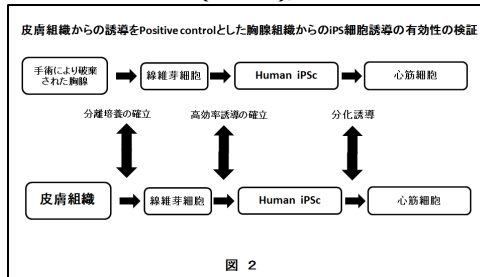
キーワード：ファロー四徴症 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

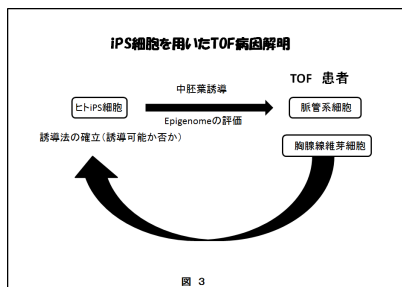
iPS 細胞は山中 4 因子による体細胞のエピゲノムリセットにより作製される多能性幹細胞であり、再生医療において最も期待が持たれる技術である。これまで山中教授が提唱してきた増殖性を有した体細胞であれば、iPS 細胞誘導は可能とする stochastic model (Stochastic model) と、特定の細胞種のみが iPS 細胞に変化する能力が備わっていると考えられる elite model (Elite model) が存在する (図 1)。



一般的には stochastic model が研究者の間に浸透しているが、分担研究者である千本松らは左心耳由来 fibroblast (この場合多くは Myofibroblast) を用いた iPS 誘導実験では、ほとんど誘導されないことを見出している (現在投稿中)。従って、human iPS 細胞誘導法、並びに最適な細胞の選択性には standard protocol は存在しない。そこで、胸腺組織由来 fibroblasts の iPS 細胞誘導性を皮膚のそれと比較しながら、最適な誘導法、並びに細胞選択性の存在を確認することが本プロジェクトの目的の 1 つである (図 2)。対象となる TOF



は、肺動脈狭窄 (漏斗部狭窄)、心室中隔欠損、右心室肥大、大動脈騎乗の 4 つの奇形を合併している先天性心疾患である。その多くは染色体異常が存在せず原因不明である。そこでこれらの患者より手術の際に得られた胸腺組織由来線維芽細胞を用いて iPS 細胞を誘導し、それらを用いて中胚葉誘導を行い、



2. 研究の目的

- (1) **胸腺 線維芽細胞分離培養系の樹立**: 胸腺組織より線維芽細胞の分離培養を確立させる。胸腺組織から本来の細胞である胸腺上皮細胞を分離培養する protocol は存在するが、皮膚組織のそれと比較する上で胸腺線維芽細胞を用いる予定である。
- (2) **胸腺 線維芽細胞より iPS 細胞誘導の樹立**: すでに成功している皮膚組織からのそれを Positive Control として、山中 4 因子以外の未分化誘導に有効であると考えられている因子の導入も試みる。
- (3) **心筋細胞 (中胚葉誘導) への誘導の樹立**: iPS 細胞の中には、未分化細胞内に強発現している因子を証左に iPS 細胞としている論文も多数存在するが、高効率な分化を示してこそ iPS 細胞である。分担研究者である千本松らが確立した中胚葉誘導 (心筋誘導) を用いて、皮膚組織からのそれと同様に高効率分化誘導を示すか検証をし、その誘導法を確立する。
- (4) **TOF の病因説明** (1) - (3) が可能であれば、誘導された iPS 細胞もしくは中胚葉系細胞 (心筋細胞や血管内皮細胞) の epigenomic な評価 (メチル化、アセチル化もしくは特異的遺伝子発現の差異) を行い TOF の病因説明を遂行する。

3. 研究の方法

胸腺組織からの線維芽細胞分離培養:

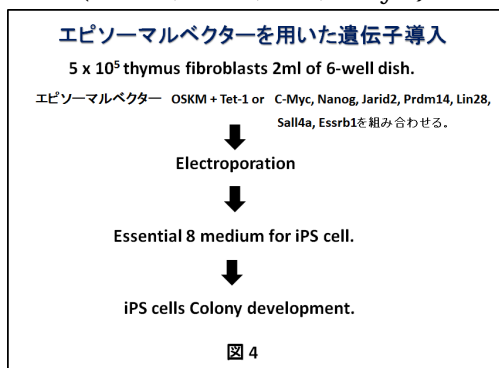
対象をファロー四徴症 (Tetralogy of Fallot; TOF) 患者さんが受ける小児心臓外科手術の際、術野確保の為に一部破棄される胸腺組織とした。TOF は、肺動脈狭窄 (漏斗部狭窄)、心室中隔欠損、右心室肥大、大動脈騎乗の 4 つの奇形を合併している先天性心疾患である。TOF の発症頻度はおよそ 1000 出生に対して 0.26-0.48 人であり、全先天性心疾患のなかで占める割合は 3.5-9.0% とされる。1981 年から 1989 年まで行われた Baltimore-Washington Infant Study (BWIS) によれば、TOF において男性の割合は 56.4% であったが、男女比に統計学的な有意差はなく、また人種間での明らかな傾向は指摘されていない。上記の奇形により全身に送られる動脈血に酸素濃度の低い静脈血が混合するためチアノーゼを起こす。自然治癒はしないため、手術を必要とする。この際、十分な術野を得るために一部胸腺が摘出される。現在では 1 歳前の手術が一般である。TOF に対する治療は、基本的には心内修復術である。近年の手術法の発達により、前述したように TOF はより低年齢で心内修復術が行われるようになった。その理由は、手術成績の向上のみならず、いち早くチアノーゼや高い右室圧を長期間継続することによる合併症 (脳膿瘍・右室心筋の線維化など) を避けることである。TOF の大半 (6-7 割) は肺動脈狭窄と心室中隔欠損の組み合わせで、染色

脈管発生分化異常を再現することにより病因を説明する (図

体は正常である。この場合は手術の成績もよく、手術後はほぼ正常の発育と生活ができる。残り 30~40%はより複雑で、予後は様々、ないし不良である。まず染色体の異常(ダウン症、染色体 22q11 欠失症)が合併すると、TOF を手術で直しても染色体異常による精神発達遅延が残る。染色体 22q11 欠失症はファロー四徴症の 15%に合併する。ファロー四徴症に肺動脈閉鎖が合併すると、しばしば肺動脈の発達が不良で、手術が複雑になる傾向がある。このように多彩な臨床症状を示す TOF の原因は、一部の患者に認められる染色体異常の存在以外は全く不明である。即ち、その多くが原因不明の分化異常疾患であり、体細胞のエピゲノムの初期化により誘導される iPS 細胞は、このメカニズムを解明するにはうってつけの実験ツールである。具体的には、組織摘出後直ちに cold PBS(-)に浸漬し乾かないようにする。手術により摘出される胸腺組織を 400mg に切り分けて、それぞれを細切する。凍結は最も細胞を傷つけるため極力避ける。細切された胸腺組織を直接細胞培養皿に接着させ (explant 法)、DMEM+20%FBS+抗生剤を基本培養液として線維芽細胞分別培養を行う。セミコンフルエントに達した後 数代継代し株化させ、凍結保存し iPS 細胞誘導用細胞とする。

胸腺線維芽細胞より human iPS 細胞の誘導:

Non-integration method としてエピソーマルベクターを用いた遺伝子導入法で行う。エピソーマルベクターとは、EBNA1 タンパク質 oriP を介して宿主ゲノムに結合し、ゲノム非組み込みのまま娘細胞でも安定した遺伝子の発現が見込めるベクターである。Addgene 社より、iPS 細胞誘導用エピソーマルベクターを購入し、Thermo 社 Neon electroporation もしくは Lonza 社 Nucleofactor を用いて最適な導入法を検討し、最も至適なプロトコルを確立する。基本的には、山中 4 因子である OSKM(Oct3/4,SOX2,Klf4,L-Myc) と脱メ

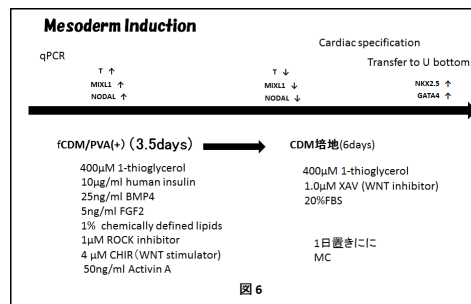
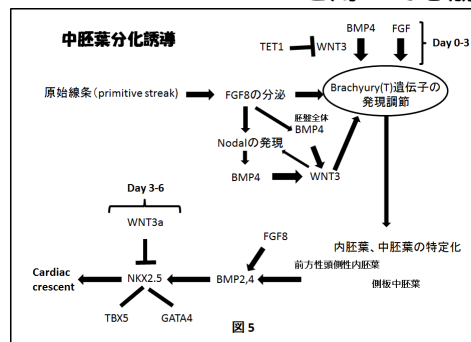


チル化酵素である Tet-1 を導入することをスタンダードプロトコルとするが、これまでに山中 4 因子以外に未分化細胞中に高発現する; C-Myc, Nanog, Jarid2, Prdm14,

Sall4a, Essrb1, Lin28 を組み合わせ、高効率誘導となるプロトコルを確立する (図 4)。

胸腺線維芽細胞より誘導された iPS 細胞の中胚葉分化誘導 (心筋細胞誘導):

中胚葉分化誘導基本的因子として TGF- ファミリーの一員である BMP4、線維芽細胞増殖因子 FGF、ActivinA そして WNT stimulator として CHIR99021 により誘導を試みる。今までの論文のほとんどが、中胚葉誘導として 2 - 4 日間の刺激を行っているため、それに準拠していく。図 5 下段、図 6 右側に示されるように、中胚葉誘導後の心筋特異的誘導の際には、逆に WNT は、NKX2.5 を抑制するため、WNT 刺激を抑制する必要がある。そのため中胚葉誘導後の心筋特異的誘導時には、WNT 抑制薬として XAV939 を約 6 日間使用し、心筋誘導を試みる。誘導は図 6 に示した如く、qPCR により特異的な遺伝子の発現で確認するが、よりわかりやすくするために、V-bottom culture dish を用いて心筋塊を



形成しやすくし、心筋収縮が見やすい環境を整える。誘導効率は、96 well V-bottom culture dish を用いて、96 wells の内、どれだけの well で心筋収縮並びに特異的遺伝子の発現が確認できるか検証を行う。

iPS 細胞を用いた TOF 中胚葉誘導異常の検証:

TOF 患者胸腺由来線維芽細胞から iPS 細胞、中胚葉系細胞が誘導されることを確認する。不可能であればそのメカニズ

ムを検証していく。

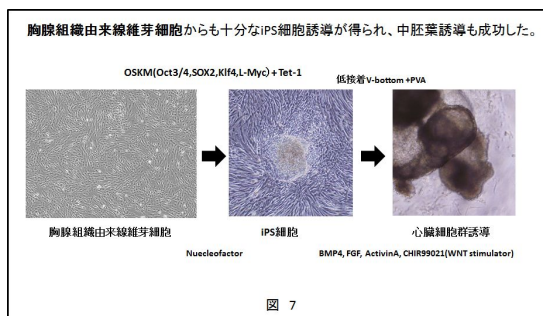
4. 研究成果

胸腺組織からの線維芽細胞分離培養：

手術により摘出される胸腺組織は5-10gあり、これらを explant 法にて4皿で培養を開始し、1患者さんより 2×10^7 量の線維芽細胞の分別が可能であった。後にRNAを抽出し、主たる間葉系細胞の代表的な遺伝子発現 (Snail2 etc) を確認したが問題なく線維芽細胞であった。加えて、筋線維芽細胞のマーカーである α -smooth muscle actin (α -SMA)も確認したが、発現は低く炎症性変化の少ない線維芽細胞であることが確認された。

胸腺線維芽細胞より human iPS 細胞の誘導：

患者年齢が極めて若いことが影響している可能性は否定できないが、Thermo 社 Neon electroporation もしくは Lonza 社 Nucleofactor のどちらを用いても比較的十分量のヒト iPS 細胞コロニーの形成を確認した(500-700コロニー/10⁶/10cm dish)。得られた iPS コロニー主たる遺伝子発現も確認したが、幹細胞として問題は認められなかった。また、山中4因子以外の導入も試みたが、導入割合、導入遺伝子、導入の順番に関して有意な差異は認めず、OSKM(Oct3/4,SOX2,Klf4,L-Myc)+Tet-1で十分量の iPS コロニーは得られた。ただし、electroporation による遺伝子導入はDNAダメージが強く、細胞生存率と遺伝子導入効率はトレードオフの関係にあり、得られたプロトコールがすべての細胞に適合した汎用性の高いか否かは今後の研究に委ねる必要がある(図7)



胸腺線維芽細胞より誘導された iPS 細胞の中胚葉分化誘導(心筋細胞誘導)並びに TOF 中胚葉誘導異常の検証：

また胸腺由来線維芽細胞から誘導されたヒト iPS 細胞を用いた中胚葉分化誘導実験として研究室で確立された実験法を用いて心筋細胞群誘導を行ったが、高効率に誘導はかかり、beating、トロポニンや GATA4, β -MHC等の心筋特異的マーカーの有意な上昇も確認されたが、TOF患者特異的な発現パターン等は認められなかった。そこでTOF患者のゲノムの評価として、RNA-seqによるwhole genome

evaluationを行い点突然変異の評価、そしてdigital PCRを用いた遺伝子コピー変異の評価、epigenomeの評価としてDNA-methylation arraysによるメチル化の評価、そしてDNA損傷評価として γ H2AXの発現量を指標にして誘導されたTOF patient derived iPS細胞の品質の評価を施行中であるが、現在まで大きな差異には至っておらず、研究を継続していく予定である。

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0件)

[図書](計0件)

[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

6. 研究組織

(1)研究代表者 鈴木孝明
(Suzuki Takaaki)

埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：10196834

(2)研究分担者 千本松孝明
(Senbonmatsu Takaaki)

埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：70216563

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()