

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21170

研究課題名(和文) ヒトES細胞由来心臓ペースメーカー細胞を用いた自動能生成メカニズムの解明

研究課題名(英文) Evaluation of cardiac automaticity using human cardiac pacemaking cells derived from human embryonic stem/ induced pluripotent stem cells

研究代表者

森川 久未 (Morikawa, Kumi)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90707217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：心臓の拍動メカニズムや、その破綻による不整脈がどのようにして起こるのかを解明するためには、ヒトの心臓ペースメーカー細胞を研究することが重要である。本研究では、ヒトES (Embryonic Stem)/iPS (induced Pluripotent Stem) 細胞および疾患iPS細胞の心筋分化誘導系からペースメーカー細胞と心室筋細胞を選別分取する方法を開発し、分取した各細胞の性状解析を試みた。本研究によって明らかとなったペースメーカー細胞の性質は、今後、不整脈に対する創薬や、再生医療に応用可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Cardiac beating function originates from cardiac pacemaker cells localized in sino-atrial node. The pacemaker cells produce the electrical pulse automatically and lead the contraction of whole heart. However, it is very difficult to isolate the pacemaker cells from human heart directly. To solve this problem, we have developed a novel system for isolating pacemaker cells (HCN4 positive) derived from human embryonic stem /induced pluripotent stem (ES/iPS) cells. In this study, we have established the dual cardiac fluorescent reporter human ES/iPS cells, in which HCN4 ion-channel and MLC2v myosin light chain gene are knocked-in with eGFP and mCherry, respectively. Electrophysiological analysis indicated that sorted eGFP positive cells showed the same phenotypes as in vivo pacemaker cells on automaticity and If currents. In conclusion, our system provides a useful platform to study the molecular mechanisms underlying cardiac automaticity as well as regenerative medicine for bradycardia.

研究分野：心臓分子生理学

キーワード：ペースメーカー細胞 ヒトES/iPS細胞 HCN4 Ifチャンネル 再生医学 イオンチャンネル 心臓 自動能

1. 研究開始当初の背景

心臓拍動は、洞結節ペースメーカー細胞から生み出される電気信号(自発活動電位=自動能)が起源となる。自動能が房室結節、刺激伝導系を通して、心室筋へと伝わり、心筋細胞の同調した収縮・弛緩と心臓全体の拍動を生み出す。そのため、ペースメーカー細胞が機能不全に陥った場合、重篤な徐脈性不整脈を発症する。治療には、機械式ペースメーカーの移植が行われ、その医療規模は、全世界で年間数兆円にも達している。しかし、多くの場合、病因は不明のままである。その原因のひとつは、洞結節ペースメーカー細胞で自動能がどのように生成するのかという、自動能の起源について理解が進んでいないことに起因している。ヒトペースメーカー細胞は心臓からの直接採取がほぼ不可能であるため、ペースメーカー細胞の研究資材としては、HEK293細胞などの心筋以外の細胞を用いた単一チャンネルの発現解析や、ウサギやモルモットなどの種の異なる自律拍動心筋細胞が用いられてきた。このため、ヒトペースメーカー細胞の解析は進んでいない。

この研究開発の現状を打破するための有用な細胞資源がヒト ES/iPS 細胞である。ヒト ES/iPS 細胞は、ヒト由来の多能性幹細胞であり、無限の増殖能と三胚葉への分化能を持つ細胞である。これらの性質から、ヒト ES/iPS 細胞は心臓を構成する様々な細胞へ分化誘導することが可能である。我々の研究からも、ES細胞の心筋分化誘導系から、ペースメーカー細胞、心室筋細胞などの各細胞を作出することができている(Yano S et al, Biomed. Res., 2009)。この細胞を用いることによって、ヒト ES/iPS 細胞からヒトペースメーカー細胞を人為的に作出し、基礎研究や再生医療へ応用することが可能となるのである。しかしながら、ヒト ES/iPS 細胞の心筋分化誘導系には多種類の心筋細胞が混在するため、ペースメーカー細胞のみを選別する

必要がある。そこで我々はこれまでに、ペースメーカー細胞に特異的に発現するイオンチャンネル HCN4 (Hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide gated K⁺ 4) を指標にペースメーカー細胞の選別分取法の開発してきた(Morikawa K et al, PACE, 2011)。そこで本研究では、これまでに樹立したヒトペースメーカー細胞分取系を改良し、心室筋細胞の同時採取を可能とする細胞の樹立と分取したヒトペースメーカー細胞並びに心室筋細胞の特性解析を立案した。

2. 研究の目的

本研究では、我々が独自に開発したヒト ES/iPS 細胞由来ペースメーカー細胞の選別分取法を基に、ヒトペースメーカー細胞と心室筋細胞を選別採取し、その機能解析を通して、心臓拍動制御機構の解明を目的とする。

また、正常な拍動制御機構に破綻が生じると、徐脈や QT 延長など不整脈疾患を発症する。このように、不整脈患者から疾患 iPS 細胞を樹立できれば、我々が開発した選別採取法を応用することによって、機能の何処が破綻して、拍動制御に異常が生じているのか、直接的に解析することができ、心臓の拍動制御機構の解明の新しい研究手法となることが期待できる。そこで、不整脈患者由来の疾患 iPS 細胞の樹立と解析系の開発・導入も目的とした。

3. 研究の方法

ヒトペースメーカー細胞とヒト心室筋細胞の選別分取には、これまでに樹立したヒト ES/iPS 細胞の遺伝子改変細胞を用いた。この遺伝子改変細胞は、ペースメーカー細胞のマーカー遺伝子である HCN4 遺伝子の発現特異的に青色蛍光タンパク質(Cyan Fluorescent Protein: CFP)または緑色蛍光タンパク質(Green Fluorescence Protein: GFP)を発現し、同時に心室筋細胞のマーカーである

Myosin Light Chain 2-ventricle (MLC2v) の発現特異的に赤色蛍光タンパク質 (mCherry) を発現する仕組みとなっている。本研究では、作製済みの二重改変ヒト ES 細胞株 (KhES3 株由来) および二重改変ヒト iPS 細胞 (409B2 株由来) に加えて、不整脈疾患モデルとして、2 種類の疾患 iPS 細胞株: 先天性 QT 延長症候群タイプ 1 (Long QT syndrome Type 1: LQTS1) およびタイプ 6 (LQTS6) を対象に、心筋の選別採取、その特性解析を行った。

(1) 二重改変ヒト ES/iPS 細胞を用いて、心筋へと分化誘導し、各蛍光の発現を指標に、セルソーターを用いた選別分取を行った。選別採取した各細胞は、遺伝子発現解析に加えて、ホールセルパッチクランプ法による電気生理学的解析と、薬剤応答性の解析を行った。(2) LQTS1 に関しては、代表者が所属する附属病院の、KvLQT1 遺伝子に新規突然変異 M437V を持つ患者から、山中 4 因子を使用して疾患 iPS 細胞を樹立した。その後、心筋へと分化誘導し、予備的な研究として、拍動細胞に焦点を当て、その電気的特性を明らかにした。そして、そのデータを基に、ペースメーカー細胞における拍動制御の制御メカニズムについて、シミュレーション実験を行った。(3) LQTS6 は、遺伝性不整脈のなかでも徐脈と QT 延長を併せ持つ特殊な疾患で、コロンビア大学矢澤真幸助教との共同研究として、この LQTS6 患者由来 iPS 細胞の供与を受け、その導入と解析を開始した。

4. 研究成果

(1) ペースメーカー細胞と心室筋細胞の選択分取系の構築

実験系の構築として、ペースメーカー細胞と心室筋細胞を選別分取できる細胞株の樹立を行った。HCN4 陽性のペースメーカー細胞を分取できるヒト ES 細胞はすでに樹立済みであるため、ヒト ES (KhES-1・KhES-3) / ヒト iPS (409B2) 細胞から心室筋細胞を分取できる

細胞株の樹立を行った。MLC2v 遺伝子の第 2 エクソンに mCherry を導入したベクターを CRISPR/Cas9 システムを用いて、各細胞に導入し、ノックイン株の樹立を行った。また、今後の汎用性を鑑みて、HCN4 の発現を GFP で追跡できるヒト iPS 細胞株の樹立も行った。樹立した細胞株に対して心筋分化誘導を行うと、拍動する心筋細胞を得ることができた。加えて、拍動部位特異的に CFP 又は GFP と mCherry を発現した。これより、ペースメーカー細胞と心室筋細胞を追跡できる HCN4-MLC2v 二重改変細胞株の樹立に成功した。

(2) 心筋分化誘導過程におけるペースメーカー細胞と心室筋細胞の発現解析

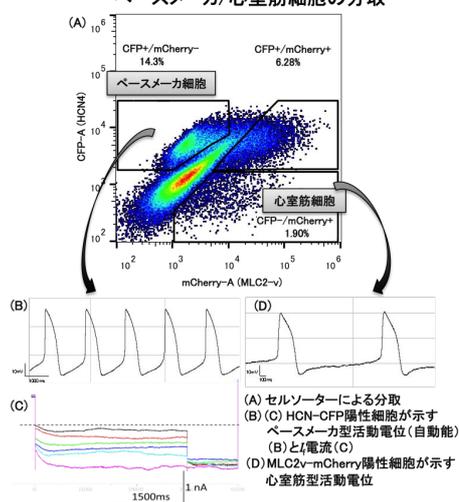
HCN4 (CFP 又は GFP) 陽性細胞と MLC2v (mCherry) 陽性細胞の心筋分化誘導過程における出現時期とその後の発現パターンを同定するために、樹立した細胞株の心筋分化誘導時の CFP 又は GFP と mCherry の発現を長期的に観察すると共に、フローサイトメーターによって発現細胞の割合を計測した。今回用いた分化誘導系 (Yamauchi K et al, Genes Cells, 2010) では、心筋分化誘導後 7~10 日目から心筋細胞が出現し、拍動が始まる。HCN4 (CFP 又は GFP) 陽性細胞はこれと同時期に、心筋拍動部位で特異的に発現が始まり、その後も拍動部位に限局して発現が維持されることが判明した。一方で MLC2v (mCherry) 陽性細胞は、分化誘導後 20 日目前後から現れることが判明した。加えて、HCN4-MLC2v 二重改変ヒト ES 細胞を用いて、マイクロアレイ用サンプルの回収を進めた。サンプル回収日を分化誘導後 0、7、10、14、21 日目、1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月後と定めて、セルソーターを用いて各陽性細胞の回収を行った。現在、マイクロアレイ解析を完了し、拍動制御機構に関連する遺伝子の解析と同定を進めている。

(3) ペースメーカー細胞と心室筋細胞の電気生

理学的特性 (図1)

続いて、各陽性細胞の特性を解析するために、心筋分化誘導2ヶ月後の各陽性細胞を分取し、ホールセルパッチクランプ法による電気生理学的解析を行った。その結果、HCN4 (CFP) 陽性細胞からは自動能を発するペースメーカー細胞が、MLC2v (mCherry) 単独陽性細胞からは、心室筋型の活動電位を発する心室筋細胞を検出することができた。以上の結果から、目的の細胞が分取できていることが証明された。

図1 ヒトES細胞由来
ペースメーカー/心室筋細胞の分取



(4) ペースメーカー細胞と心室筋細胞の薬剤応答性

さらに、ヒト ES/iPS 細胞由来ペースメーカー細胞、心室筋細胞の特性解明として、薬剤応答性の解析を行った。分取したペースメーカー細胞はカリウムチャンネル、カルシウムチャンネル、ナトリウムチャンネルの各種ブロッカーに対する応答性を示すことが分かった。その応用濃度は、生体のペースメーカー細胞の応答濃度と同濃度であったことから、分取したヒト ES/iPS 細胞由来ペースメーカー細胞は、生体の細胞と同等の特性を示し、拍動の制御メカニズムの解析や創薬開発へも応用できることが明らかとなった。

(5) LQTS1 患者由来心筋細胞の解析

患者の抹消血リンパ球から、山中4因子を用いて、LQTS1-iPS 細胞を樹立した。M437V 変異を確認した後、心筋への分化誘導を行い、

予備的な実験として、拍動する心筋細胞を対象に、パッチクランプ法で電気生理学的特性を解析した。その結果、 I_{Ks} 電流が減少し、活動電位持続時間 (APD) が延長していることが分かった。一方、その他の Na、Ca 電流などは正常であった。これらのパラメータを用いて、コンピュータシミュレーションをすると、患者の APD 延長が再現できるのみならず、アドレナリン刺激によって早期後脱分極 (EAD) を惹起しやすいことが予測された。

本研究では、自律拍動細胞を対象として解析したため、対象とした細胞のサブタイプは不明であった。現在、HCN4 と MLC2v の発現を指標とした可視化 - 選別採取法の導入を進めており、洞結節ペースメーカー細胞と心室筋細胞を分取したうえで、生理学的解析を行い、それぞれ細胞で KvLQT1 の M437V 変異と拍動制御との関連を解明したいと考えている。

(6) LQTS6 患者由来 iPS 細胞の導入

LQTS6 は、カリウムチャンネルのサブユニット *Mirp1* の M57V 変異を原因とする疾患である。徐脈と QT 延長の二つを病態として持つことが特徴である。心筋のサブタイプに応じて、HCN4 をはじめとするさまざまなカリウムチャンネルと結合し、拍動制御の様々な局面で機能していると考えられる。また、どの心筋でどのイオンチャンネル分子と結合し、どの種の電流の生成に関わっているのかを明らかにできれば、拍動制御の実態に迫ることができると考えられる。そこで、米国コロンビア大学の矢澤助教から LQTS6-iPS 細胞の供与を受け、心筋へ分化誘導したところ、患者特有の徐脈の病態が示されることを確認した。現在、我々が確立したペースメーカー細胞選別分取法の LQTS6-iPS 細胞への導入を進めており、HCN4 を指標にペースメーカー細胞を、MLC2v を指標に心室筋細胞を分取し、関与するチャンネルと病態との関連を明らかにする予定である。

以上の成果から、我々の選別分取法を用い

て、生体と同等の特性を持つヒトペースメーカー細胞と心室筋細胞が分取可能であることが示された。現在これらの特性解析の結果をまとめて論文を執筆中であり、研究成果を国際幹細胞学会で発表する。また今後はこのペースメーカー細胞を用いた拍動制御メカニズムの解明や、この細胞を利用した再生医療や創薬など、医学への貢献も視野にいれた研究開発を進めていきたいと考えている。

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 5 件)

Onohara T, Hisatome I, Morikawa K, Shirayoshi Y, Nishimura M, et al (共著者 18 名中 6 番目). Molecular mechanisms underlying the pilsicainide-induced stabilization of hERG proteins in transfected mammalian cells. Journal of Arrhythmia. 査読有. in press. 10.1016/j.joa.2016.09.003

Sogo T, Morikawa K, Fukuda Y, Shirayoshi Y, Hisatome I, et al (共著者 14 名中 2 番目).

Electrophysiological Properties of iPS Cell-Derived Cardiomyocytes from a Patient with Long QT Syndrome Type 1 Harboring the Novel Mutation M437V of KCNQ1. Regenerative Therapy. 査読有. Vol 4, 2016, pp9-17. 10.1016/j.reth.2015.12.001

森川久未, 白吉安昭, 久留一郎. 生物学的ペースメーカーの展望. 心電図. 査読無. Vol 35, No.4, 2016, pp264-268. 10.5105/jse.35.264

Maharani N, Ting YK, Morikawa K, Shirayoshi Y, Hisatome I, et al (共著者 15 名中 10 番目). Molecular Mechanisms Underlying Urate-Induced

Enhancement of Kv1.5 Channel Expression in HL-1 Atrial Myocytes. Circ J. 査読有. Vol 79 No.12 (2015) pp2659-68. 10.1253/circj.CJ-15-0416
Endo R, Li P, Morikawa K, Shirayoshi Y, Hisatome I, et al (共著者 15 名中 4 番目). Stabilization of Kv1.5 channel protein by the inotropic agent olprinone. European Journal of Pharmacology. 査読有. Vol 765, (2015) pp488-94. 10.1016/j.ejphar.2015.09.013

[学会発表](計 11 件)

Shirayoshi Y, Fukumura K, Morikawa K, Hisatome I. Fluorescent human iPS reporter lines offer useful platforms to study cardiac subtype specification and cell-based therapies of cardiac disease. ISSCR (International Society of Stem Cell Research) 2017 Annual Meeting. (2017 年 6 月 14~17 日) Boston, USA.
Shirayoshi Y, Morikawa K, Fukumura K, Hisatome I. Fluorescent Human iPS/ES Reporter Lines Offer the Opportunity to Track Cardiac Subtype Cells in Cell-based Therapies and Drug Development. 第 81 回 日本循環器学会 学術集会 (2017 年 3 月 17~19 日) 金沢, 石川県立音楽堂他.

福村健太, 横井文香, 森川久未, 野崎大蔵, 久留一郎, 白吉安昭. ヒト iPS 細胞に由来する HCN4 陽性心筋前駆細胞の解析. 第 39 回 日本分子生物学会年会 (2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日) 横浜, パシフィコ横浜.

白吉安昭, 森川久未, 山内香織, 横井文香, 福村健太, 野崎大蔵, 末盛博文, 久留一郎. 選別純化したヒト多能性幹細胞由来分化誘導心筋に関する電気生

理学的特性と薬剤応答性の評価. 第 43 回 日本毒性学会 (2016 年 6 月 29 日～7 月 1 日) 名古屋, ウィンクあいち.

Shirayoshi Y, Morikawa K, Miake J, Hisatome I. Generation of biological pacemaker derived from human pluripotent stem cells. 第 80 回 日本循環器学会学術集会 (2016 年 3 月 18～20 日) 仙台, 仙台国際センター.

Endo R, Kurata Y, Li P, Morikawa K, Kondo T, Ogura K, Miake J, Yamamoto K, Shirayoshi Y, Hisatome I. Stabilization of Kv1.5 Channel Protein by Olprinone as a Chemical Chaperone. 第 80 回 日本循環器学会学術集会 (2016 年 3 月 18～20 日) 仙台, 仙台国際センター.

Kurata Y, Li P, Morikawa K, Miake J, Yamamoto K, Shirayosi Y, Hisatome I. Electrophysiological Properties of iPS Cell-Derived Cardiomyocytes from a Patient with LQT1 Harboring the Novel Mutation M437V of KCNQ. 第 80 回 日本循環器学会学術集会 (2016 年 3 月 18～20 日) 仙台, 仙台国際センター.

Endo R, Kurata Y, Li P, Morikawa K, Kondo T, Ogura K, Miake J, Yamamoto K, Shirayoshi Y, Hisatome I. Stabilization of Kv1.5 Channel Protein by Olprinone. 第 30 回 日本不整脈学会学術集会・第 32 回 日本心電学会学術集会合同学術大会 (2015 年 7 月 28～31 日) 京都, 京都国際会議場.

Kurata Y, Li P, Morikawa K, Miake J, Yamamoto K, Shirayoshi Y, Hisatome I. Electrophysiological properties of iPS cell-derived cardiomyocytes from patients with long QT syndrome type 1 harboring a novel mutation KCNQ1. 第 30 回 日本不整脈学会学術集会・第 32

回 日本心電学会学術集会合同学術大会 (2015 年 7 月 28～31 日) 京都, 京都国際会議場.

Morikawa K, Daizou N, Shirayoshi Y, Hisatome I. Isolation and Characterization of HCN4 positive cells derived from human embryonic stem cells. ISSCR (International Society of Stem Cell Research) 13th Annual Meeting. (2015 年 6 月 24～27 日) Stockholm, Sweden.

森川久未. 生物学的ペースメーカー細胞による再生医療を目指して. 第 7 回 再生医療フォーラム in 山陰. (2015 年 5 月 25 日) 米子, 米子全日空ホテル.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

鳥取大学大学院医学系研究科 機能再生 医科学専攻 遺伝子再生医療学講座 再生医療学部門
<http://www.med.tottori-u.ac.jp/regmed/>

生物学的心臓ペースメーカー細胞の作成とその応用
<http://www.med.tottori-u.ac.jp/introduction/grad/297/430/563/1345.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森川 久未 (MORIKAWA, Kumi)
鳥取大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 90707217

(3) 連携研究者

久留 一郎 (HISATOME, Ichiro)
鳥取大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 60211504

白吉 安昭 (SHIRAYOSHI, Yasuaki)
鳥取大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 90249946

(4) 研究協力者

矢澤 真幸 (YAZAWA, Masayuki)