

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15846

研究課題名（和文）高品質ヒトiPS細胞を用いた成熟心筋分化誘導法の確立

研究課題名（英文）Establishment of mature cardiomyocyte differentiation system using higher-quality human iPS cells

研究代表者

國富 晃（Akira, Kunitomi）

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：30570882

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：当研究ではヒト卵母細胞特異的に発現しているリンカーヒストンH1F00をコードしている遺伝子であるH1F00を、iPS細胞樹立に用いる4つの転写因子と共に体細胞に導入することで、従来の方法よりも高効率かつ均一な心筋分化能を持つ高品質なヒトiPS細胞を効率良く作製する方法を開発した。また現在広く用いられているプライム型ヒトiPS細胞よりもより高度な多分化能を持つと考えられているナイーブ型ヒトiPS細胞を、H1F00を用いて体細胞から直接効率良く樹立する方法を確立した。更にナイーブ型ヒトiPS細胞が心筋分化の前段階である中胚葉系への高度な分化能を持つことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトiPS細胞は循環器領域では分化誘導した心筋を用いた研究や再生医療への応用が期待されている。しかしながらヒトiPS細胞は細胞株間での質のばらつきが大きく、それに付随して心筋分化効率や分化心筋の成熟度なども不均一であることが重大な問題となっていたが、本研究成果はそれらの問題を解決する可能性を持っていることを示した。更に本研究では現在広く用いられているプライム型ヒトiPS細胞よりも高度な多分化能を持つと考えられているナイーブ型ヒトiPS細胞を体細胞から樹立する方法を確立したことで、循環器領域のみならず幅広い分野におけるヒトiPS細胞の更なる可能性を広げた。

研究成果の概要（英文）：We discovered that the oocyte-specific linker histone H1F00 has beneficial effects on higher-quality human iPSC generation. Induction of H1F00 with OCT4, SOX2, KLF4 and LMYC significantly enhanced the efficiency of primed state human iPSC generation. H1F00 promoted cardiomyocyte differentiation property with low heterogeneity in generated primed state iPSCs. Furthermore, we established a novel method to generate naive state human iPSCs directly from somatic cells. Interestingly, H1F00 promoted the efficiency of naive state iPSC generation as well as primed state iPSC. We confirmed that the naive iPSCs have favorable mesoderm differentiation potency.

研究分野：多能性幹細胞

キーワード：iPS細胞 心筋細胞 プライム型 ナイーブ型 H1F00

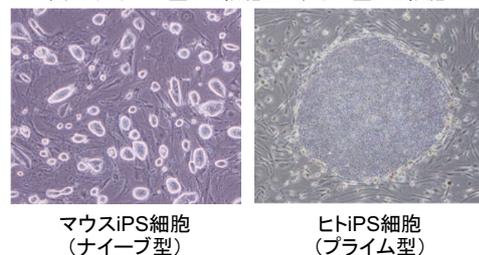
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト iPS 細胞は循環器領域においても様々な臨床応用が大いに期待されており、具体的には iPS 細胞からの分化心筋を用いた創薬・安全性スクリーニング、疾患モデリング、分化心筋の大量培養による移植治療などが挙げられるが、その実現に向けた安全性の確保と汎用化には依然として数多くの問題が挙げられている。具体的には樹立されたヒト iPS 細胞のトランスクリプトームや分化能などはクローン間のみならずクローン内の個々の細胞間でも不均一性が認められており、心筋分化誘導においてもその分化誘導効率はクローン間で大きなばらつきがあるのみならず、同クローンにおいてすらも分化誘導を行う度に誘導効率にばらつきが生じる。また得られた iPS 細胞由来分化心筋は未成熟な心房・心室・刺激伝導系細胞が不均一に混在した状態であるため、同じ細胞群内においても機械的・電気生理学的特性が著しく異なり、かつ未熟な表現型のため機能的な心筋細胞としては不十分であるのみならず、電気学的特性の不均一性は移植心筋が不整脈源性となりうるなど数多くの重大な問題が依然として存在する(Leschik J. Stem cells Dev. 2015)。これらの問題は iPS 細胞の元となる体細胞のエピジェネティックメモリーの残存(Kim K. Nature. 2010)や初期化に伴う異常 DNA メチル化(Stadtfield M. Nature. 2010)など、完全な初期化が得られていないことによる iPS 細胞の質の不均一性が、不完全な心筋分化能に繋がっている(Hartman M.E. Adv Drug Deliv Rev. 2016)と考えられており、根本的な解決のためにはより理想的なヒト iPS 細胞の樹立法を開発することが必要である。しかしながら現状ではヒト iPS 細胞および分化心筋の質の改善と均一化を示した新規樹立法の報告は殆ど存在しない。

マウス iPS 細胞は着床前受精卵の内細胞塊に近い性質を持ち、ナイーブ型 iPS 細胞とも呼ばれ高度な多分化能を持つ。これに対し、現状樹立されているヒト iPS 細胞は着床後受精卵のエピブラストに近い特性を持ちプライム型 iPS 細胞と呼ばれ、ナイーブ型よりも扁平なコロニーを形成し、多分化能も限定される傾向があるほか、遺伝子改変も困難であるなど再生医療の臨床応用における諸問題の解決をより困難にしている(図 1)。近年この点を克服すべく、特定の多能性遺伝子の強制発現やサイトカインの添加により、マウス iPS 細胞と類似した形態と機能を持つナイーブ型ヒト iPS 細胞の樹立が報告されている(Theunissen T.W. Cell Stem Cell. 2014, Takashima Y. Cell. 2014)。ナイーブ様ヒト iPS 細胞はマウス iPS 細胞と同様のドーム型コロニーを形成し、遺伝子改変効率の改善が得られている(Yang Y. Stem cells Transl Med. 2016)。また海外では異種間キメラの作製に成功する(Jun Wu. Cell. 2017)などプライム型よりも高い多分化能を持つ可能性が報告されており、心筋分化においてもより優れた分化能を示す可能性が示唆されるが、現状ではナイーブ型ヒト iPS 細胞の心筋分化への応用に関する報告は殆ど存在しない。また既報のナイーブ型ヒト iPS 細胞は全て既存のプライム型ヒト iPS 細胞から得る方法であり、ヒト体細胞から直接ナイーブ型ヒト iPS 細胞を得る方法は確立されていない。ナイーブ型ヒト iPS 細胞の再生医療への応用を視野に入れた場合、ヒト体細胞から直接ナイーブ型 iPS 細胞を得る方法を確立することは急務と考えられる。

図1. ナイーブ型iPS細胞とプライム型iPS細胞



我々はこれまでに母性特異的リンカーヒストン H1foo が、より多分化能に優れた高品質なマウス iPS 細胞を高効率に樹立することを解明した(Kunitomi A. Stem Cell Reports. 2016)。この研究成果を基に、本研究においてヒトにおいてもその配列、局在および機能も類似したマウス H1foo のホモログであるヒト H1FOO をヒト iPS 細胞への初期化に応用することで、より心筋分化能に優れたプライム型ヒト iPS 細胞を樹立することができるかを検証することにした。更によりマウス iPS 細胞に近いナイーブ型ヒト iPS 細胞を体細胞から直接樹立する方法を確立し、H1FOO がその効率を高めることができるかを比較検証するとともに、樹立したナイーブ型ヒト iPS 細胞が心筋分化への応用が可能かどうか検討を試みることにした。

2. 研究の目的

卵母細胞特異的に発現しているリンカーヒストン H1FOO を、iPS 細胞を樹立するための 4 つの転写因子とともにヒト体細胞に導入することで、心筋分化効率がより良好な質の高いプライム型 iPS 細胞を作製することができるかを検証した。またヒト体細胞から直接ナイーブ型 iPS 細胞を作製する方法を確立し、H1FOO がその効率を高めることができるかを比較検証するとともに、心筋分化への応用が可能であるかも検討を試みた。

3. 研究の方法

本研究では導入遺伝子が宿主ゲノムに組み込まれないため安全性が高く、かつ遺伝子導入効率が高、かつ非常に高いセンダイウイルスベクターを用いて、現在ヒト iPS 細胞の初期化遺伝子として用いられている OCT4, SOX2, KLF4, LMYC (以下 OSKL) に H1FOO を加えてヒト体細胞に導入し、新たなプライム型およびナイーブ型ヒト iPS 細胞の樹立を試みた。特にナイーブ型に関しては様々な培地および基質の条件、遺伝子発現量および発現時期を検討し、ナイーブ型の形態はもとよりナイーブ型に特異的なグローバルな遺伝子発現および脱メチル化を示すナイーブ型ヒト iPS 細胞が樹立できるかを検証した。

次に OSKL に H1FOO を加える (以下 OSKLH) ことで、対照群である OSKL と比較してプライム型およびナイーブ型ヒト iPS 細胞の樹立効率が改善されるかを検証した。続いて OSKL と OSKLH で多数のクローンを樹立し、そのトランスクリプトームおよびメチロームを解析し、クローン間のばらつきについての比較を行った。またこれらのクローンについて三胚葉成分への初期分化能を調べるため、胚様体形成よりも再現性の高い方法として接着培養および各胚葉成分専用の無血清培地を用いた STEMdiff Trilineage differentiation kit による三胚葉成分への分化誘導を行い、分化細胞を回収した後に TaqMan hPSC Scorecard Assay を用いて半網羅的に遺伝子発現解析を行った。さらに心筋細胞への分化能を多数のクローン間で施行し、フローサイトメトリーでトロポニン T 陽性細胞の比率を解析することで心筋分化効率の比較を行った。ナイーブ型ヒト iPS 細胞もプライム型と同様に三胚葉分化能を評価し、心筋分化への応用が可能かどうかを検証した。また H1FOO がプライム型およびナイーブ型ヒト iPS 細胞への樹立にどのような影響を与えているかのメカニズムを解明するため、OSKLH 導入後早期の細胞を回収し RNA-seq を行うことで、その鍵となる新規遺伝子の探索を行った。

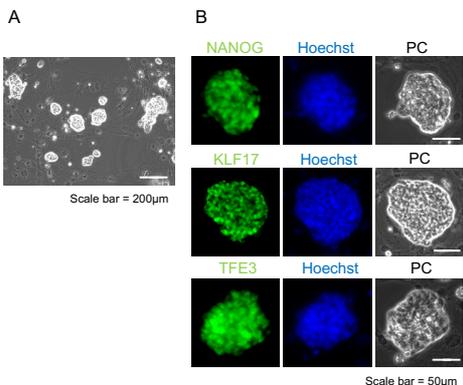
4. 研究成果

(1) H1FOO の追加導入によるプライム型およびナイーブ型 iPS 細胞樹立と樹立効率の比較検討

プライム型ヒト iPS 細胞樹立は既に一般的に行われているフィーダーフリーでの樹立法を用いてヒト皮膚線維芽細胞およびヒト末梢血単核球から樹立を行った。ナイーブ型ヒト iPS 細胞はプライム型と同様にセンダイウイルスベクター導入後、放射線照射後マウス胎児線維芽細胞 (iMEF) 播種済みの培養容器上に播種し、低酸素およびナイーブ用培地を用いることでドーム型形状を呈するナイーブ型ヒト iPS 細胞の樹立に成功した。免疫染色において樹立ナイーブ型ヒト iPS 細胞は NANOG および KLF17 の高発現を認めた他、ナイーブ型に特異的である核内における TFE3 の高発現も認めた (図 2)。

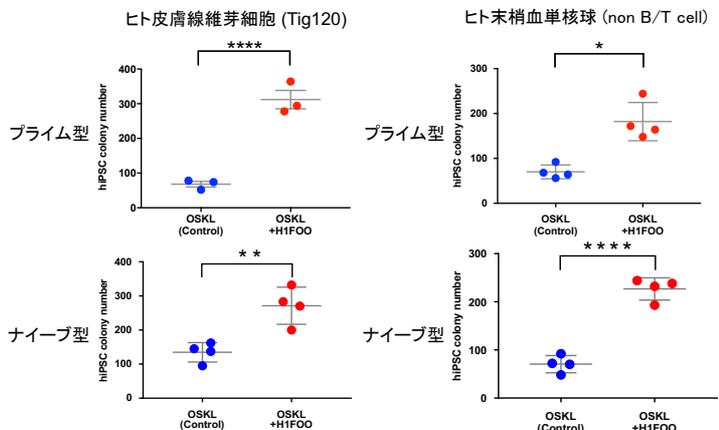
また OSKL のみと OSKLH でプライム型およびナイーブ型の樹立効率を比較したところ、興味深いことにいずれの樹立条件においても、また元の体細胞種を問わず OSKL のみの対照群と比較して、OSKLH 導入群ではアルカリフォスファターゼ陽性コロニー数が有意に増加した (図 3)。

図2. 体細胞から直接樹立したナイーブ型ヒトiPS細胞



A: マウスES/iPS細胞と同様にドーム型のコロニーを形成
B: NANOG, KLF17の強発現およびTFE3の核内発現を確認

図3. 各種体細胞からの初期化効率の比較
(プライム型: day20, ナイーブ型: day14, AP positive colonies from 5x10⁴/well)



*p < 0.05, **p < 0.01, ****p < 0.0001

(2) 樹立したプライム型 iPS 細胞の遺伝子発現や多分化能などの機能評価

次にヒト皮膚線維芽細胞およびヒト末梢血単核球に OSKL または OSKLH を導入して多数のプライム型およびナイーブ型 iPS 細胞クローンを樹立し、その機能評価を行った。まずプライム型においては皮

膚線維芽細胞由来クローンを OSKL と OSKLH で 8 クローンずつ計 16 クローンを樹立し、RNA-seq およびメチル化アレイを行ってそのトランスクリプトームおよびメチロームを比較した。クローン間における遺伝子発現およびメチル化のばらつきを比較するため、統計学的手法を用いてクローン間において一定上の値のばらつきを示した遺伝子群を抽出した。驚くべきことに OSKLH-iPS 細胞群では発現のばらつきが大きい遺伝子数が OSKL-iPS 細胞群と比べて約半分に抑えられており、メチル化アレイの結果も同様であった。次にこれら多数のクローンを接着培養で三胚葉成分へと分化誘導し、多分化能の比較を行った。外胚葉および中胚葉成分の分化能については両群に有意差は認められなかったが、この実験系では最も分化誘導が困難な内胚葉への分化誘導において、OSKLH-iPS 細胞群はより均一かつ高い分化効率を示した(図 4)。次に心筋分化能についての比較を行った。両群それぞれ 3 クローンずつを用いて、同じクローンで計 6 回心筋分化誘導を行い、cTnT 陽性細胞の比率をフローサイトメトリーで計測するとともに、免疫染色で形態的にも心筋細胞が生じているかを確認した。興味深いことに OSKLH-iPS 細胞群は均一により高い心筋分化能を示した(図 5)。これらのことから H1FOO はプライム型ヒト iPS 細胞において、樹立効率の向上はもとより樹立クローン間の遺伝子発現及びメチル化のばらつきを抑制することのみならず、三胚葉成分のうち最も分化誘導が困難な内胚葉系へのより優れた初期分化能と、より高度な心筋分化能を持つ iPS 細胞を作製する能力があることが判明した。

図4. プライム型OSKLH-iPS細胞はより優れた内胚葉系への初期分化能を示した

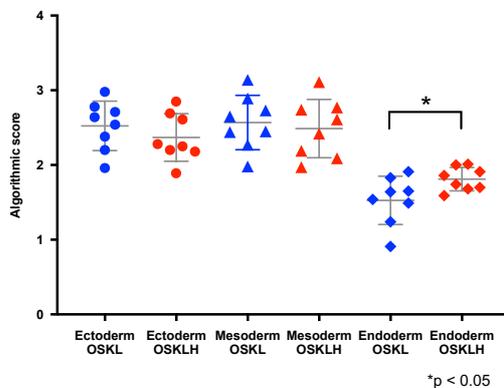
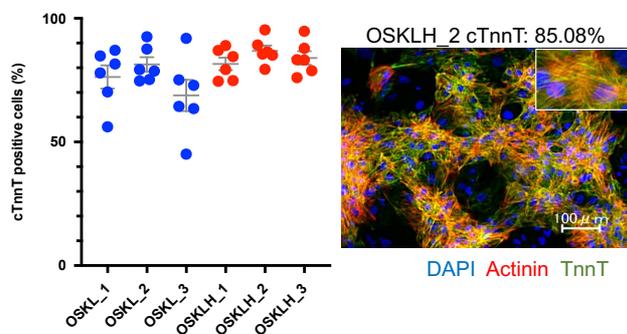


図5. プライム型OSKLH-iPS細胞はより優れた心筋分化能を示した

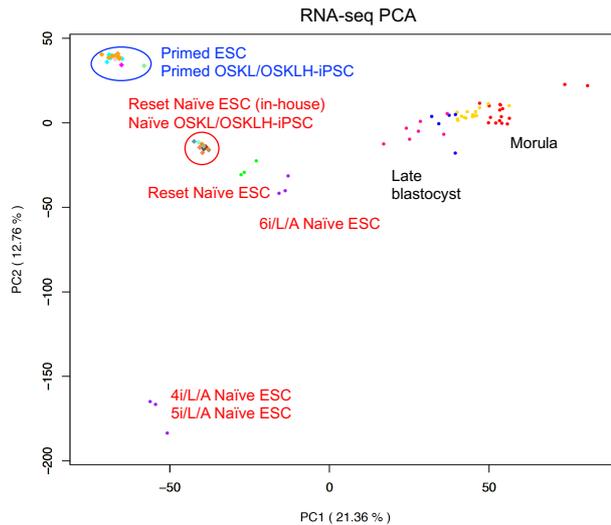


(3) 樹立したナイーブ型 iPS 細胞の遺伝子発現や多分化能などの機能評価

ナイーブ型においてもプライム型と同様の検討を行った。皮膚線維芽細胞および末梢血単核球に OSKL または OSKLH を導入して多数のナイーブ型 iPS 細胞を樹立し、その機能評価を行った。RNA-seq でトランスクリプトームを、メチル化アレイでメチロームを解析し、我々が樹立したプライム型ヒト iPS 細胞および既報のナイーブ型ヒト iPS 細胞と比較した。樹立したナイーブ型ヒト iPS 細胞は、OSKL もしくは OSKLH いずれも主成分分析においてプライム型とは明確に区別され、かつ既報のナイーブ型ヒト iPS 細胞と同じ群に位置しており、我々が樹立したナイーブ型ヒト iPS 細胞は少なくとも既報のナイーブ型ヒト iPS 細胞とはほぼ同等の遺伝子発現およびメチル化プロファイルを持つことを確認した(図 6)。次にプライム型での検証と同様にクローン間の遺伝子発現およびメチル化のばらつきについても比較を行った。プライム型と同様に OSKLH-iPS 細胞群の方がクローン間の遺伝子発現およびメチル化のばらつきが抑制されており、更に興味深いことにナイーブ型の方がこの傾向は顕著に現れていた。このことから H1FOO の追加導入による遺伝子発現やメチル化のばらつきの抑制は、プライム型よりもナイーブ型の方がより効果的である可能性が示唆された。

次にナイーブ型の多分化能の評価を行った。プライム型と同様の接着培養による分化誘導方法では分化誘導がうまくいかなかったため、96well プレートを用いて胚様体を形成させて三胚葉成分への分化能を、既報のナイーブ型ヒト ES 細胞とともに比較検証した。我々が樹立したナイーブ型ヒト iPS 細胞はナイーブ型ヒト ES 細胞と同等の三胚葉分化能を示し、特に中胚葉系への分化誘導に優れていることが判明した。この結果をふまえて今後ナイーブ型から心筋分化を誘導する方法の確立を試みる方針である。

図6. ナイーブ型OSKL/OSKLH-iPS細胞は既報のナイーブ型に極めて類似した遺伝子プロファイルを示した



(4) H1FOO の強制発現に伴う新たな初期化メカニズムの解明

上記の結果の通りプライム型およびナイーブ型ヒト iPS 細胞樹立において、OSKL に加えて H1FOO を導入することで、より樹立株間の質のばらつきの少ない iPS 細胞が効率良く樹立できることが判明した。H1FOO によって発現が制御され、この効果を生み出していると考えられる新規因子を検索するため OSKL または OSKLH を導入後 day2 および day5 の初期化早期の 3 種類の皮膚線維芽細胞を回収し、どのような発現変動遺伝子が存在するかを RNA-seq を用いて解析した。統計解析の結果 27 個の発現変動遺伝子が抽出され、更にその中から絞り込みを行うべく個々の遺伝子を単独でヒト皮膚線維芽細胞に強制発現させ、その細胞に OSKL を導入し初期化効率を比較した。その結果 FKBP1A および APOE3 がプライム型およびナイーブ型いずれにおいても有意に初期化効率を改善させることが判明した。FKBP1A は主な機能として FK506 に結合しカルシニューリンを阻害する機能を持つことが知られており、既報においてリプログラミングに影響が生じる機能としては ALK5 のリン酸化を阻害することが知られている。しかしながら我々の検証においてはリプログラミング過程において FKBP1A は ALK5 の下流にある SMAD2/3 のリン酸化を促進しており、リプログラミング過程において生じる間葉上皮移行も促進することが判明した。また APOE3 は脂質代謝やコレステロール輸送に重要な役割を担うリポタンパクとして知られているが、リプログラミング過程においては APOE3 強制発現細胞と対照群では脂質代謝に有意な差は認めなかったため、別のメカニズムによりリプログラミング効率を改善している可能性を考え今後更なる究明を行う方針とした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 國富晃
2. 発表標題 臨床応用へ向けての高品質なヒトiPS細胞樹立方法の開発
3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akira Kunitomi
2. 発表標題 Generation of higher quality of human iPS cells using oocyte specific chromatin remodeling factor
3. 学会等名 The 3rd JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 國富晃
2. 発表標題 卵母細胞特異的リンカーヒストンを用いた新たなヒトiPS細胞リプログラミング
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 國富晃
2. 発表標題 母性因子を用いた質の高いヒトiPS細胞樹立法の開発
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----