

平成 22 年 5 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19591617

研究課題名（和文）マウス ES 細胞による心筋ペースメーカー細胞の樹立と新たな細胞ペーシング療法の開発

研究課題名（英文）Establishment of cardiac pacemaker cells differentiated from mouse ES cells and Development of new transplantation therapy with artificial pacemaker cells.

研究代表者

柳 堅徳 (YANAGI KENTOKU)

富山大学・大学病院・助教

研究者番号：60447654

研究成果の概要（和文）：マウス ES 細胞よりペースメーカー細胞を単独に分化誘導し、洞不全症候群に対する細胞移植治療の糸口を見出すことが私の目的であるが、いまだにペースメーカー細胞たるに必要な条件（性質）は報告されていない。心臓ペースメーカー細胞を単離し、治療手段とするにはペースメーカー細胞たる必要十分条件を規定せねばならず、先ずはその探索を行った。方法としては未分化細胞の段階で心筋特異のプロモーターの下流に GFP を配置したプラスミドを導入し、心筋に分化した際には蛍光下で緑に光る細胞を分化誘導した。引き続きフローサイトメトリーにて GFP 陽性細胞を心筋細胞として単離し、パッチクランプ法にて単一拍動心筋細胞の電気生理学的なイオンチャンネル解析を行った。

その結果、いわゆる心臓ペースメーカー細胞と呼ばれる細胞には HCN チャンネルと Cav チャンネルが過剰発現しており、Kir チャンネルはダウンレギュレートされている事実が判明した。

上記の事実よりチャンネル上の性質と照らし合わせて性質の一致する細胞を単離できれば心臓ペースメーカー細胞のみの回収が可能となる。ひいてはペースメーカー細胞の移植治療へと繋がっていく。また、すでに RNAi を用いて転写因子 X 遺伝子を RNA レベルで抑制することで HCN チャンネルの過剰発現、Cav チャンネルの過剰発現、Kir チャンネルの発現低下がおこることが分かっている。上記の事実を踏まえペースメーカー細胞の単離、同定、移植を目指して実験を進める予定である。

研究成果の概要（英文）：We found balanced regulation of ion channel expressions, especially HCNs and Cav3s in cardiomyocytes should be important to constitute the spontaneously beating properties in ES cell-derived cardiomyocytes, and for the generation of complete biological pacemakers. However, little has been reported concerning regulatory mechanisms of HCNs and Cav3s ion channel expression during cardiomyocyte differentiation. We know overexpression of the dominant negative form of neuron-restrictive silencer factor (NRSF) transcription factor in cardiomyocytes led to increase of HCN2, 4 and Cav3.2 mRNA expressions, and NRSF regulated HCN4 transcription in vitro. Recently, a T-box transcriptional repressor, Tbx3 was reported to be involved in SA-node development and control various ion channel expressions. Manipulation of HCNs and Cav3s expression may be possible by controlling these regulatory machineries. So now we transfect plasmid expressing dominant negative type NRSF to mouse ES cells to establish biological pacemaker cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：胸部外科学

科研費の分科・細目：再生医学

キーワード：心臓大血管外科学、ペースメーカー、再生医学

1. 研究開始当初の背景

マウス ES 細胞よりペースメーカー細胞を単独に分化誘導し、洞不全症候群に対する細胞移植治療の糸口を見出すことが私の目的であるが、いまだにペースメーカー細胞たるに必要十分な条件(性質)は報告されていない。年間約 2 万 5000 件を数える永久型ペースメーカー埋め込み術の大半は洞不全症候群によるものであるが、ペースメーカー埋め込みには 1 件につき約 250 万円の費用を要する。本研究を用いた治療はこれらの負担を軽減できる。また世界現状としても

i)心筋細胞は再生医療研究の中心的ターゲットの一つであり、様々な細胞を用いて心筋の分化誘導や再生の試みがなされているが、それらはおもに、ポンプ機能としての心筋再生を目指しているものであり、ペースメーカー細胞や洞不全症候群をターゲットとした研究はほとんど行われていない。

ii)心筋分化誘導は、ES 細胞や骨髄細胞を中心とした体細胞を用いて盛んに行われ、数多くの報告を見るが、ペースメーカー細胞の特異的な分化誘導や純化に関してはいまだ報告されていない。

☆骨髄細胞等の体細胞研究では、培養下での自己拍動は認めないことが多く、ペースメーカー細胞の誘導も報告されていない。

☆ES 細胞研究では、マウス、ヒト ES 細胞ともに培養下に自己拍動する心筋細胞が出現する。心房筋、心室筋に加え、ペースメーカー細胞特性を有する細胞も混在していると考えられているが、ペースメーカー細胞の分化機構や特異的な分化誘導は報告されていない。

iii)心臓再生に関する細胞移植実験においても、移植細胞の心臓への寄与が示されている

のみであり、移植細胞や生着細胞の心臓における機能的意義や分類はなされておらず、ペースメーカー細胞としての寄与やペースメーカーの再生も示されていない。

拍動心筋細胞を含む ES 細胞胚様体をブタ心臓に移植し、ペースメーカーとしての機能を果たしうる得ることを示した報告はあるが (Kehat et al, Nat Biotechnol 22: 1282-1289 2004)、標的細胞の純化を全く行っていないため、臨床応用は難しい。という状態である。

2. 研究の目的

上記の背景を受けて、洞不全症候群根治を可能とする新しい細胞ペーシング療法の開発を目的とし、ES 細胞を用いたペースメーカー細胞の分化誘導および純化とモデル動物への移植実験により、ペースメーカー細胞の再生による新しい細胞治療技術の開発を行う。

1)ES 細胞からの効率的ペースメーカー細胞分化誘導および純化の開発。

2)モデル動物への細胞移植

実験による治療効果の検討を行い、ペースメーカー再生による新たな根治的治療法の可能性を開拓する。

3. 研究の方法

I ES 細胞を用いた効率的ペースメーカー細胞分化誘導法の確立：

現在申請者らが見出している ES 細胞分化途上における遺伝子抑制によるペースメーカー細胞誘導効果を検証し、そのメカニズムを明らかにする。

i)テトラサイクリン誘導性ショートヘアピ
ン RNA(shRNA)発現による

NRSF(neuron-restrictive silencer factor)遺伝子発現阻害実験：申請者等はベクターを用いた shRNA 発現システムを進め、テトラサイクリンの添加により ES 細胞の任意の分化段階において shRNA 発現し(Tet-on)、標的遺伝子の発現を阻害することの出来る ES 細胞対応の shRNA 発現システムを構築している。すでに、血管内皮細胞分化途中上において、内皮分化に必須の遺伝子である Fik1 に対する shRNA を発現させることにより、Fik1 の発現を抑制するとともに内皮細胞分化を抑制することに成功している。本実験を用いて拍動心筋細胞を増加させることに成功し、免疫化学的なアッセイでもペースメーカー電流を形成するチャンネルの発現が増加することも確認した。

ii)テトラサイクリン誘導性遺伝子発現による NRSF(neuron-restrictive silencer factor) 遺伝子過剰発現：申請者らはすでに、テトラサイクリン誘導性に cDNA 発現を誘導できる(Tet-off)ES 細胞システムを構築している。遺伝子 NRSF の cDNA もすでに得ており、ES 細胞分化途上における遺伝子 NRSF 過剰発現の効果のペースメーカー細胞分化における効果を検討してきた。

iii)テトラサイクリン誘導性ドミナントネガティブ NRSF 遺伝子発現：申請者らは既に、遺伝子 NRSF のドミナントネガティブ変異体も構築している。I - ii)のシステムを用いて同変異体の誘導性過剰発現を行い NRSF 遺伝子作用の抑制によるペースメーカー細胞分化を検討する。

II 誘導ペースメーカー細胞の純化と機能解析：I で誘導したペースメーカー細胞を純化する方法を開発するとともに、純化細胞の電気生理学的検討を行い、ペースメーカー細胞としての機能を検証する。

i) HCN4 プロモーターおよび Myosin heavy chain(MHC)プロモーターによるペースメーカー細胞ソーティングシステムの構築：誘導ペースメーカー細胞を純化するために予め ES 細胞が未分化な段階で HCN4 プロモーター-EGFP と α MHC プロモーター-DSRed の両遺伝子を導入し、心筋に誘導することで HCN4 と α MHC が同時に発現した心筋細胞（ペースメーカー細胞）のみソートするシステムを構築する。

すでに両 cDNA は得ている。

ii)誘導細胞の電気生理学的検討：：上記で誘導した細胞がペースメーカー細胞であるか否かは、免疫化学的なアッセイによるイオン

チャンネルの発現確認のみだけではイオンチャンネルの機能自体の確認がなされておらず、到底、移植治療につながる実験にはならない。したがって、その電気生理学的な機能を確認する目的で膜電位固定法を用いて、作成した細胞がペースメーカーに存在すべきイオンチャンネルが存在し、電気生理学的に機能しているか否かを検討する。

III 洞不全動物モデルの構築：細胞移植実験に備えて、洞不全動物モデルの構築を行う。マウスにおける洞結節凍結（または焼灼）破壊モデルやブタで用いられているヒス束結紮による房室ブロックモデルなどにより、ペースメーカー細胞移植効果の検討が可能なモデルを作成する。

4. 研究成果

いわゆる心臓ペースメーカー細胞と呼ばれる細胞には HCN チャンネルと Cav チャンネルが過剰発現しており、Kir チャンネルはダウンレギュレートされている事実が判明した。上記の事実よりチャンネル上の性質と照らし合わせて性質の一致する細胞を単離できれば心臓ペースメーカー細胞のみの回収が可能となる。ひいてはペースメーカー細胞の移植治療へと繋がっていく。また、すでに RNAi を用いて転写因子 NRSF 遺伝子を RNA レベルで抑制することで HCN チャンネルの過剰発現、Cav チャンネルの過剰発現、Kir チャンネルの発現低下がおこることが分かっている。上記の事実を踏まえペースメーカー細胞の単離、同定、移植を目指して実験を進める予定である。

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 1 件)

"Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels and T-Type Calcium Channels Confer Automaticity of Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes" Stem Cells 25. 2712-2719 (2007), 1

[学会発表] (計 2 件)

"羊膜未分化細胞の樹立並びに心筋・血管への分化誘導についての考察" 日本心臓血管外科学会第 39 回総会シンポジウム. (20090422). 富山

"マウス ES 細胞由来心筋細胞におけるイオンチャンネルの解析" 日本外科学会第 108 回定期学術集会 一般口演. (20080517). 長崎

〔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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳 堅徳 (YANAGI KENTOKU)

富山大学・大学病院・助教

研究者番号：60447654

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：