

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K20206

研究課題名(和文)人工受容体によりG-CSFシグナルを制御する経済的かつ効率的な心臓再生療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of efficient and economical myocardial regeneration therapy using artificial G-CSF receptor.

研究代表者

植山 萌恵 (UEYAMA, TOMOE)

立命館大学・総合科学技術研究機構・研究員

研究者番号：60844280

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)：iPS細胞を用いた心筋再生療法が期待されている。G-CSFなどの増殖因子は心筋細胞分化促進効果や心筋保護作用などを有しており、これらの因子によるシグナル伝達を制御することは、iPS細胞からの効率的な心筋細胞誘導だけでなく、移植後の生着効率の改善にも繋がると考えられる。しかし、組換えタンパク質の精製はその費用から高額医療の原因となる。問題解決に向け、本研究では、G-CSF受容体の細胞外ドメインの一部を、代替分子に反応する抗体可変部領域に置換したキメラ受容体を構築し、これを発現するiPS細胞から、安価な代替リガンド刺激により、JAK/STAT経路を活性化し効率的な心筋細胞分化促進に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、人工受容体を用いて安全かつ効率的・経済的にiPS細胞から心筋細胞を作製する系を確立した。この人工受容体をiPS細胞へ安定発現させることで、安価な代替リガンド刺激により、心筋分化促進因子の一つG-CSFの細胞内シグナル伝達が制御可能となった。人工受容体の最大の特色と利点は、安価で入手し易くかつ生理活性のない分子をリガンドとして用いる点にある。代替リガンドの調整コストは、本来のリガンドである組換えG-CSFタンパク質に比較して、20分の1程度であり経済的な分化誘導を実現しており、この手法は他の受容体に対しても構築が可能で、広い汎用性から再生医療へ大きな貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：It has been of great demand for cardiac regeneration therapy to produce sufficient number of cardiomyocytes from pluripotent stem cells. However, it remains challenging to efficiently differentiate cardiomyocytes with low costs. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor (GCSFR) signaling is known to activate JAK/STAT signaling and enhance cardiac differentiation from pluripotent stem cells, including embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells (iPSCs).

In the present study, we generated chimeric GCSFRs in which single chain Fv of anti-fluorescein (FL) antibody was ligated to transmembrane/cytoplasmic domains of GCSFR. As an inexpensive alternative ligand FL-conjugated, bovine serum albumin can bind to the chimeric GCSFRs, activate the JAK/STAT3 pathway, and enhance the efficiency of cardiac differentiation from iPSCs. This work could contribute to stem cell-based cardiac regeneration therapy as an economical and powerful strategy.

研究分野：再生医学

キーワード：人工受容体 多能性幹細胞 分化

1. 研究開始当初の背景

重症心不全に対する、再生療法が期待されている。人工多能性幹 (iPS) 細胞は成人の体細胞から樹立できるため、これを目的の細胞へ分化させて移植する治療の実用化が期待されている。再生療法を実現するためには移植に必要とされる十分量の細胞を iPS 細胞から分化培養法により作り出さねばならない。現在の培養技術では多大なコストを要することから、医療経済的な問題が課題となっている。重症心不全に対して iPS 細胞由来の心筋シートを移植する治療が臨床試験のステージへ進んでいるものの、これを保険医療に適応し多くの患者に提供できるようになるには、安価で効率的な培養方法により iPS 細胞から心筋細胞へ分化誘導する技術と、移植後の生着効率を高める方法を開発することが重点課題と考えられる。

心臓発生に関する研究成果などから、種々の増殖因子の添加が分化培養系において iPS 細胞から心筋細胞への分化を促進させることが知られている。中でも、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) は心筋細胞分化促進効果や心筋保護作用などを有しており、これらの因子によるシグナル伝達を制御することは、iPS 細胞からの効率的な心筋細胞誘導だけでなく、移植後の生着効率の改善にも繋がると考えられる。しかし、増殖因子の生体投与は移植細胞以外にも作用するため、その副作用が懸念される。さらに、生体で安定して作用する組換えタンパク質の精製は高額であることから、効率的な iPS 細胞の作製と移植効果を高めるための増殖因子を用いた治療は、高額医療となり実用化は容易でない。

そこで、研究代表者らは分化効率の向上とコスト削減の目的から、G-CSF などの増殖因子により惹起される細胞内シグナルを安価な代替リガンドを用いて幹細胞に伝達できる人工受容体を構築し、これを安定発現する多能性幹細胞を用いた新たな再生医療の開発を目指し研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究では重要な細胞内シグナル伝達を可能とする人工受容体を作製することで経済的な心筋の作製を行う。すなわち、心筋分化の促進効果や細胞保護作用などを有する G-CSF に対する人工受容体を作製し、これを iPS 細胞に安定発現させることで、代替リガンド投与による細胞内シグナル伝達を解析し、心筋分化効率や移植後生着率の改善について検証することを目的に研究を実施する。

本研究では、抗原抗体反応を利用することによって、組換え G-CSF タンパク質に代わる安価な小分子リガンドによりシグナル伝達を活性化させ、これを心臓再生療法へ応用することを目指す。人工受容体の最大の特色と利点は、安価で入手し易くかつ生理活性のない分子をリガンドとして用いてシグナル伝達を制御できるということである。

3. 研究の方法

はじめに、G-CSF 受容体 (GCSFR) タンパク質中のリガンド結合部位を含む細胞外ドメインを、G-CSF とは異なる分子を認識・結合するドメイン構造に置換した人工受容体の作製を試みる。この細胞外ドメインとして、フルオレセイン分子を抗原として認識する一本鎖化された抗体の変換部領域 (single-chain variable fragment: scFv) を用いることで、G-CSF 以外の代替リガンドに反応し G-CSF と同様のシグナルを伝達することが可能になると予想される。そこで、本研究では、フルオレセイン分子 (Fluorescein, FL) をウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) にコンジュゲートさせた BSA-FL を代替リガンドとし、scFv には FL を抗原として認識する抗 FL-scFv を用いた。FL は、それ単独では免疫応答を惹起しないハプテン抗原であり、生理活性も持たない小分子であるため、生体投与への応用も期待される。

iPS 細胞に安定発現させるためのベクターには、CAG (cytomegalovirus early enhancer/chicken β actin) promoter をもつレンチウイルスベクターを用いた。このレンチウイルスベクターを作製するために packaging 細胞へ一過性に発現させるプラスミドは、抗 FL-scFv に対応する遺伝子断片とその下流に IRES (internal ribosome entry site) 配列およびネオマイシン耐性遺伝子を含む pLenti-CAG-scFv-IRES-Neo を基本としている。これに、GCSFR の膜貫通ドメインから細胞内ドメインを含む内因性の領域に対応する遺伝子断片を挿入したプラスミドを用いて、キメラ GCSFR とネオマイシン耐性遺伝子を共発現するレンチウイルスベクターを作製することができる。その後、マウス未分化 iPS 細胞に、上記のレンチウイルスを感染させた後、G418 硫酸塩で選択し安定発現株を樹立して実験に用いた。

次に、このキメラ受容体を安定発現する iPS 細胞株を用いて、G-CSF 細胞内シグナル伝達の解析を Western blotting 法により実施した。一次抗体には、Total-STAT3 または Phospho-STAT3 に対するウサギポリクローナル抗体を、二次抗体には、Horse radish peroxidase をもつ抗ウサギ IgG 抗体を反応させた後、化学発光反応により目的のタンパク質の発現レベルを可視化し、そのシグナル強度を ImageJ ソフトウェアを用いて定量化した。iPS 細胞からの分化誘導は、胚様体 (embryoid body, EB) 形成を介して実施した。酵素処理により細胞を解離した後、6000 細胞を 96 ウェル低接着プレートの各ウェルへ播種することで EB 形成を促した。細胞播種後は、2

日毎に新たな培地を各ウェルへ添加し、浮遊培養開始 6 日後に EB を回収した。引き続き、ゼラチンでコーティングした 48 ウェルプレートの各ウェルへ 1 つずつ EB を播種することで接着培養に移行した。培養中は顕微鏡により経過観察を行い、細胞塊の自己拍動が観察されたものについて、蛍光カルシウム指示薬である Fluo-8 AM を用いたカルシウムイメージングによる解析も施行した。

また、接着培養により分化した心筋細胞を含む EB は、D-PBS(-)により洗浄した後、10%ホルマリンを含む D-PBS(-)溶液に室温で 15 分間浸漬させ固定した。D-PBS(-)で 2 回洗浄して残存するホルマリンを除去した後、0.5% TritonX-100 を含む D-PBS(-)溶液で室温にて 15 分間、細胞膜透過処理を施行した。その後、3%の正常ヤギ血清で室温 45 分間のブロッキング処理を行い α -actinin (Calbiochem) に対する一次抗体反応を 4 °C で一晩実施した。二次抗体には anti-rabbit IgG-Alexa594 を用いて室温 60 分で反応させ、蛍光顕微鏡により観察を行った。さらに、分化誘導後の EB から total RNA を回収し、逆転写反応を行った後、SYBR® Premix Ex Taq™ II を用いてリアルタイム PCR 反応を行い、遺伝子発現量の定量的解析を行った。

4 . 研究成果

はじめに、キメラ GCSFR を安定発現する iPS 細胞株を樹立し、代替リガンド BSA-FL によるシグナル伝達の活性化を解析した。G-CSF 受容体の下流の主要経路である JAK/STAT3 経路に着目し、リガンド刺激後の STAT3 リン酸化レベルの時間応答性を検証した。BSA-FL 刺激後、0、5、10、15、30、60 分後にタンパク質抽出液を回収し、Western blotting 法により STAT3 のリン酸化レベルを解析した結果、リン酸化応答のピークは刺激後 10 から 30 分後であることが判明した。続いて、STAT3 シグナル伝達の代替リガンドに対する濃度依存性を解析した。上記の iPS 細胞株を 0、0.01、0.1、1 μ g/mL の BSA-FL で刺激し、リン酸化 STAT3 レベルを Western blotting 法により検証した。タンパク質抽出液は、先に述べたリン酸化レベルの時間応答性解析の結果から、リン酸化レベルがピークを迎える刺激後 15 分で回収した。実験結果から、濃度依存的な STAT3 リン酸化シグナルの亢進が認められており、本研究の検討範囲内においては最大濃度である 1 μ g/mL の BSA-FL で刺激した時に最大となった。これらの結果から、本研究で構築したキメラ GCSFR が、代替リガンド BSA-FL に対して、時間応答性及び濃度依存性をもって細胞内シグナル伝達を惹起することが示された。

次に、キメラ GCSFR を安定発現する iPS 細胞株から心筋細胞への分化効率が代替リガンド刺激で亢進するか否かを検証した。分化誘導は EB 形成により行い、EB 形成開始時を分化初日として、それぞれ 6、7、8 日目に 1 μ g/mL の BSA-FL を 24 時間暴露した。分化開始から 20 日以上の観察を行い、周期的な拍動が観察された EB の割合を自己拍動率として評価した。その結果、自己拍動する EB が一定の割合で認められており、心筋細胞への分化能を有していることが確認された。さらに、自己拍動性の心筋様細胞について、心筋特異的マーカーである cardiac α -actinin タンパク質に対する抗体を用いて免疫染色を施行した。BSA-FL を処置していない状態でも、自己拍動が観察された箇所には cardiac α -actinin の陽性シグナルが検出されたが、BSA-FL 処置を施したのものについては、よりそのシグナルが顕著であり、分化亢進効果が確認された。形態学的にも心筋様の構造が確認されたことから、キメラ GCSFR を導入した iPS 細胞から誘導された自己拍動性の心筋様細胞について、生理学的な機能面における解析を行った。具体的には、カルシウムイオンに対する蛍光インディケーター Fluo-8 を用いたカルシウムイメージング実験の結果、自己拍動を呈する領域においては、協調した蛍光強度の変動が反復して観察され、心筋細胞に特徴的なカルシウムオシレーションが確認された。

最後に、分化誘導過程における心筋マーカー遺伝子の発現解析を定量 RT-PCR 法により施行した。EB 播種後 7 日目に 1 μ g/mL の BSA-FL を 24 時間処置したのちに、培養を継続した 22 日目の細胞サンプルを回収し、リアルタイム PCR 法を用いた分化マーカー遺伝子の発現解析を行った。幼若な心筋マーカー遺伝子のうち、 β -MHC 遺伝子、Nkx2.5 遺伝子の発現には、BSA-FL 処置の有無によって有意な発現の変動は確認されなかった。一方で、Tbx5 遺伝子や、幼若心筋と成熟心筋の両方のマーカーである Gata4 遺伝子、成熟心筋のマーカーである cardiac α -Actinin 遺伝子、 α -MHC 遺伝子の発現は、BSA-FL 処置により有意な上昇を認めた。さらに、これらの発現上昇効果は、JAK 阻害剤によりキャンセルされたことから、キメラ G-CSF 受容体発現 iPS 細胞の分化誘導過程における BSA-FL 刺激は、JAK/STAT3 シグナル依存的に心筋マーカー遺伝子の発現を上昇させ、それが心筋様の自己拍動細胞への分化効率上昇に寄与している可能性が示唆された。

本研究で用いた代替リガンド BSA-FL のコストは、精製 G-CSF タンパク質に比較して、概算で 20 分の 1 程度に削減できる可能性があることから、本研究で構築した人工受容体であるキメラ GCSFR を iPS 細胞からの心筋分化誘導法に応用することで、より安価なリガンドで特異的なシグナル伝達誘導を介した心筋細胞の調製が可能となる。これは iPS 細胞をベースとした再生医療が克服すべき課題の 1 つである経済性の問題に対して、一定の寄与を示すものであると期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 水田友里、柳澤和輝、青木隆浩、原田恭弘、植山萌恵、高津 藍、中尾 周、川村晃久
2. 発表標題 誘導性心筋細胞へのダイレクトリプログラミングにおけるイソクエン酸脱水素酵素の役割
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柳澤和輝、馬場藍、植山萌恵、十河孝浩、中尾周、川村晃久
2. 発表標題 3アドレナリン受容体による心拍制御機構の解析
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 植山萌恵、石田智明、原田恭弘、中原正登、水田友里、馬場藍、長谷川浩二、中尾周、川村晃久
2. 発表標題 心筋ダイレクトリプログラミングにおける好気性代謝制御因子IDHの役割
3. 学会等名 第6回日本心血管協会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳澤和輝、石田智明、植山萌恵、土井晃大、馬場藍、長谷川浩二、中尾周、川村晃久
2. 発表標題 3アドレナリン受容体の心拍制御への関与
3. 学会等名 第6回日本心血管協会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakao S, Yanagisawa K, Ueyama T, Hasegawa K, Kawamura T.
2. 発表標題 Beta-3 adrenergic receptors in the sinoatrial node for heart rate regulation.
3. 学会等名 The 26th international society of cardiovascular pharmacotherapy (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ishida T, Ueyama T, Baba A, Hasegawa K, Nakao S, Kawamura T.
2. 発表標題 The effect of IDH silencing in direct reprogramming to cardiomyocytes.
3. 学会等名 The 26th international society of cardiovascular pharmacotherapy (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------