

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24615003

研究課題名(和文) ヒト胚性幹細胞を用いた領域特異的な心筋分化誘導法の開発

研究課題名(英文) Establishment of a culturing system that enables selective induction of specific cardiac cell types from human pluripotent stem cells

研究代表者

山内 香織 (Yamauchi, Kaori)

京都大学・再生医科学研究所・研究員

研究者番号：50503653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ヒト胚性幹(ES)細胞を用いた心筋分化モデルをもとに、各種心筋細胞の初期発生過程を解明し、領域特異的な分化誘導法の開発を目的とする。心筋前駆細胞の単離同定および特性解析を行うために、細胞表面マーカーをスクリーニングし、4つの前駆細胞マーカー候補を同定した。マーカーを指標に前駆細胞の選別・解析を行い、ヒトES細胞由来の心筋前駆細胞は多能性を有していることを明らかにした。また、Nkx2-5EGFP/w / Mlc2vmCherry/wダブルノックインヒトES細胞株の樹立を行い、心臓発生のごく初期から領域決定に至る後期までの幅広い過程をリアルタイムで追跡可能なシステム構築に成功した。

研究成果の概要(英文)：Human pluripotent stem cell (hPSC)-derived cardiomyocytes are expected to be a valuable cell source for transplantation therapies. Although many methods to obtain a large amount of the cardiomyocytes from the hPSCs have been developed, effective protocols for selective induction of the specific cardiac cell types such as ventricular, atrial, and pacemaker cells are yet to be established. To address the issue, we investigated the expression of cell surface proteins at different stages of cardiac development and found some markers that may be useful to identify the developmental origin of cardiomyocytes. We also established NKX2-5eGFP / MLC2vmCherry hESCs, which enable labeling, tracing and purifying the ventricular-specific cells from the differentiated cells. The culture system we established in the study allows monitoring the development process of the cardiac tissue cells from early to late stages.

研究分野：細胞生物学

キーワード：心筋細胞 多能性幹細胞 分化

1. 研究開始当初の背景

ヒト胚性幹 (ES) 細胞や人工多能性幹 (iPS) 細胞由来の心筋細胞は、損傷を受けた心臓を再生させるための有効な移植細胞ソースとして期待されている。これまでに、ヒト ES 細胞から心筋細胞を得るための様々な方法が確立され、実際に、マウスやラット心臓への移植実験によりその心機能の改善が報告されている。しかしながら、特定の心臓領域、心房筋、心室筋あるいはペースメーカー細胞だけを選択的に分化誘導できるという報告例はまだない。将来的に、例えば心室領域への細胞移植を考えた時、移植細胞集団へのペースメーカー細胞の混入は不整脈の要因となると予想され、均一な移植細胞を得ることは非常に重要な課題となる。

特定の心筋細胞を選択的に誘導するためには、心臓の各領域の心筋細胞がどのように発生してくるのかを理解する必要がある。心臓の各領域は心臓原基の特定の領域から分化してくる。心臓原基は一次心臓形成領域と二次心臓形成領域に分けられ、例えば、心臓の前方 (右心室、流出路) は二次心臓形成領域から発生し、Isl1 陽性細胞はこの領域の前駆細胞である。Nkx2-5 遺伝子もまた、心臓発生の初期にその発現が始まるため、心臓原基形成後のマーカーとして用いられている。しかしながら、Isl1 や Nkx2-5 を発現する細胞は、心筋細胞以外の様々な系譜の細胞に分化する多能性を有するという報告もあり、各種心筋細胞の発生過程をとらえることをより複雑にしている。

このような心臓の初期発生に関する基礎的な知見は、その多くがニワトリ胚やマウス胚をモデルにしている。一方で、ヒトにおいては胚を用いた初期発生研究が難しく、その理解は遅れている。ニワトリやマウスでの初期発生のメカニズムがヒトにあてはまらない例もあり、ヒトの初期発生モデルの確立は非常に重要である。

申請者は、これまでにヒト ES 細胞を個体の初期発生を模倣した培養環境下におくことで、より効果的に機能的な心筋細胞を得ることに成功している。この誘導法では、個体発生と同様に、ヒト ES 細胞を原条領域へと分化させることが可能である。ほ乳類の心臓発生が、原条細胞が将来の心臓形成予定領域へと移動していくところから始まることを考えると、申請者のヒト初期発生モデルは、ヒトにおける心臓の初期発生をとらえるための理想的なモデルであるといえる。さらに、原条形成過程の細胞を単離同定し、その細胞特性を解析することで、心臓発生の始まりから機能的な心筋形成までの幅広い発生過程を理解するための新たなアプローチを提供できるものと考えられる。

2. 研究の目的

申請者がこれまでに確立したヒト ES 細胞を用いた初期発生モデルをもとに、ヒトの心臓

の初期発生をさらに深く理解することで、特定の心筋細胞を選択的に誘導するための方法を開発することを目的とする。本研究期間では、特に以下の項目に焦点をあてながら進めてきた。

ヒト ES 細胞由来の原条前側領域はどういった細胞集団から構成されているか、表面抗原マーカーを用いて評価する。それをもとに、原条形成期の心筋前駆細胞を単離同定する。

心房筋、心室筋、ペースメーカー細胞がどのような前駆細胞から分化誘導されてくるのかをその多分可能性も含めて解析する。

各種心筋細胞の特異的マーカー遺伝子を選別し、これらのマーカー遺伝子を指標に各細胞を単離同定し、特性解析を行う。

これらの結果をもとに、心房、心室、刺激伝導系の各領域細胞を選択的に誘導するための分化誘導法を開発する。

3. 研究の方法

本研究での心筋分化誘導は、基本的には次のように行った。ヒト ES 細胞に GSK3 阻害剤と BMP シグナル阻害剤 (Noggin) を添加することにより、前側原条細胞へと分化誘導した (ステージ 1 とした)。次に、この細胞集団を BMP および FGF 存在下で細胞塊を形成させ、心筋細胞を誘導した (ステージ 2 とした)。

ステージ I へと分化誘導した 5 日目の細胞集団から、心筋分化能を有する前駆細胞集団の単離・同定を試みた。242 種の細胞表面マーカーをスクリーニングし、7 つの候補マーカーをまず選別した。これらの候補マーカーは単独では、ES 細胞と分化細胞を識別することが難しく、各マーカーを組み合わせることで、前駆細胞の同定を試みた。各マーカーで選別される細胞集団中に心筋前駆細胞が含まれているかについての検討は、拍動細胞の出現率、遺伝子発現解析、および心筋細胞の割合によって判断した。

(1) 心筋細胞の前駆細胞が多能性を有しているかを検討するために、1 細胞からの心筋分化を試みた。細胞の挙動を追跡しやすいように、常に GFP を発現するヒト ES 細胞を用いた。GFP 発現細胞は、同じ手法で前側原条細胞へと分化誘導し、前駆細胞集団を選別後に 1 細胞ずつ培養皿へと播種した。培養皿には、あらかじめ GFP を発現しない細胞を播種しておき、細胞塊中での心筋分化を試みた。GFP 陽性細胞が心筋細胞へと分化していることは、Nkx2-5 タンパク質の発現で確認した。

(2) Nkx2-5 遺伝子は、心臓原基形成後のマーカーとして用いられている。本研究におけるヒト ES 細胞からの分化誘導において、各発生段階における Nkx2-5 の発現、および Nkx2-5 陽性細胞の遺伝子発現解析を行った。リアルタイムな遺伝子発現解析を行うために、Nkx2-5 ノックインヒト ES 細胞株を用いた。細胞株は、共同研究によりオーストラリ

アのグループから分与を受けた。

(3)Isl1 は、二次心臓形成領域の重要な責任遺伝子となっている。遺伝子発現解析から、Isl1 はステージ2への誘導後すぐに発現が観察される。そこで、ステージ2の各発生段階の細胞を用いて、Isl1 および Nkx2-5 発現細胞の割合を調べ、申請者の誘導法によって、二次心臓形成領域が形成されているのかを調べた。

心室筋、心房筋およびペースメーカー細胞を区別するためのマーカーを選別した。先行研究の結果をもとに、心室筋には Mlc2v 遺伝子、心房筋には Mlc2a 遺伝子、ペースメーカー細胞には HCN4 遺伝子を候補マーカーとしてリストアップした。これらのマーカーの組織特異性については、ラットおよびヒト心臓の各心筋細胞・組織を用いて検討した。

(1)ラットおよびヒトにおける Mlc2v の発現は、心室筋でのみ観察された。その結果をふまえて、ヒト ES 細胞由来の心室筋の選別には、Mlc2v 遺伝子が適当であると判断し、Mlc2v ノックインヒト ES 細胞株を作製した。下記(2)の理由により、心房特異的マーカーを同定できなかったため、Nkx2-5 ノックイン細胞株をベースに用いることとした。ノックインの方法としては、まず一般的な相同組換えを行ったが、ノックイン株は樹立できなかった。次に、CRISPR/Cas9 システムを用いてノックイン株の樹立を試み、*Nkx2-5^{EGFP/w} / Mlc2v^{mCherry/w}* ダブルノックインヒト ES 細胞株の作製に成功した。

(2)心房筋のマーカーとして、Mlc2a を検討したが、ラットの心室筋細胞およびヒトの心室筋組織でも発現が観察され、心房および心室筋細胞の識別は難しいと判断した。そこで、Nkx2-5 および Mlc2v 遺伝子をマーカーとして用いることで、心房細胞を識別できるのではないかと考えた。Nkx2-5 陽性 Mlc2v 陰性の細胞が心房細胞の特性を有しているかを電気生理学的解析により調べていく。

(3)ペースメーカー細胞の選別には HCN4 遺伝子が有効であると思われるが、一方で幼弱型の心筋細胞も HCN4 を発現している。実際に、ステージ2の過程のごく初期に HCN4 の発現が確認できるため、HCN4 単独でペースメーカー細胞と判断できるかは、より詳細な解析が必要である。共同研究により、Mlc2v および HCN4 ダブルノックイン細胞株の樹立をすすめている。

4. 研究成果

ヒト ES 細胞を用いた正常発生に沿った心筋分化誘導モデルをもとに、心筋前駆細胞の単離同定を試みた。GSK3 インヒビターと Noggin 添加によって誘導した5日目の細胞集団について242種の細胞表面マーカーをスクリーニングし、7つの候補マーカーを同定した。その中で CD140b および CD141 の組み合わせで得られる3つの細胞集団の中で、特に

CD140b^{high},CD141^{pos} 集団で心筋細胞が濃縮されることを明らかにした。CD49f および CD184 の組み合わせで得られる2つ細胞集団においては、CD49f^{high},CD184^{neg} 集団からのみ心筋細胞が誘導されることを突き止めた。これらの結果から、分化誘導5日目の細胞集団中に心筋前駆細胞が含まれることを明らかにした。

(1)心筋前駆細胞の多分化能性を検討するために、CAG プロモーターによって GFP を発現するヒト ES 細胞を用いて、CD49f^{high}, CD184^{neg} 集団について FACS を用いてシングルセルソーティングを行い、GFP を発現しない細胞集団の中で心筋分化を試みた。その結果、1GFP 陽性細胞からの心筋分化誘導率は平均10%であり、そのうち心筋細胞だけが分化誘導されたケースは1.2%であった。このことは、CD49f^{high}, CD184^{neg} 集団中に含まれる心筋前駆細胞は多分化能性を有していること強く示唆している。

(2)Nkx2-5 の発現は、ステージ2誘導後すぐに確認される。Nkx2-5 ノックイン細胞株についても、ステージ2誘導後2日目には約15%の GFP 陽性細胞が観察された。その発現は、分化誘導が進むにつれて強くなり、誘導後4日目には GFP 陽性率は約60%であった。GFP 陽性細胞は1~2ヶ月の長期培養を経ても、自立拍動能を有していた。また、Nkx2-5 陽性細胞は、ステージ2誘導後2~3日のうちに TroponinT などのサルコメア形成を示す心筋マーカーをすでに発現していることが確認できた。

(3)Isl1 および Nkx2-5 の発現解析から、ステージ2の初期における細胞集団は、90%近い細胞が Isl1 および Nkx2-5 タンパク質をともに発現していることを明らかにした。この結果は、本研究の分化誘導法では、二次心臓領域の心筋細胞が主に誘導されていることを示唆する。

心臓の各領域の心筋細胞を単離同定するために、*Nkx2-5^{EGFP/w} / Mlc2v^{mCherry/w}* ダブルノックインヒト ES 細胞株の樹立を行った。EGFP および mCherry の発現パターンは、内在性の Nkx2-5 および Mlc2v 遺伝子の発現と一致していること、Nkx2-5-EGFP の発現は、拍動細胞が出現するまでに確認されるが、Mlc2v-mCherry の発現は拍動細胞の出現後しばらくしてから観察されることがわかった。Mlc2v-mCherry 陽性の細胞は、1~2ヶ月の培養期間を経ても自立拍動性を示すことを確認した。これらの細胞の電気生理学的な機能解析は共同研究として進めており、心室筋細胞としての細胞特性や成熟性等については、その結果が待たれる。

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 3件)

Liu L, Yuan Q, Shi J, Li X, Jung D, Wang L, Yamauchi K, Nakatsuji N, Kamei K, Chen Y. Chemically-defined scaffolds created with electrosun synthetic nanofibers to maintain mouse embryonic stem cell culture under feeder-free conditions. *Biotechnol Lett.*, 34(10):1951-7, 2012

Hirata N, Nakagawa M, Fujibayashi Y, Yamauchi K, Murata A, Minami I, Tomioka M, Kondo T, Kuo TF, Endo H, Inoue H, Sato S, Ando S, Kawazoe Y, Aiba K, Nagata K, Kawase E, Chang YT, Suemori H, Eto K, Nakauchi H, Yamanaka S, Nakatsuji N, Ueda K, Uesugi M. A Chemical Probe that Labels Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep.*, 27;6(6):1165-74, 2014

Igawa K, Kokubu C, Yusa K, Horie K, Yoshimura Y, Yamauchi K, Suemori H, Yokozeki H, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Katayama I, Takeda J. Stem Cells Transl Removal of reprogramming transgenes improves the tissue reconstitution potential of keratinocytes generated from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med.*, 3(9):992-1001, 2014

〔学会発表〕(計 3件)

富岡麻衣子、藤林悠人、平田直、山内香織、南一成、永田紅、山中伸弥、中辻憲夫、末盛博文、上杉志成、植田和光、蛍光プローブ(KP-1)の ES/iPS 細胞特異的筑西における ABC タンパク質の関与、第 85 回日本生化学大会、2012 年 12 月 14 日~16 日 福岡

Nao Hirata, Masato Nakagawa, Yuto Fujibayashi, Kaori Yamauchi, et al., Fluorescent Chemical Probes for Human Stem Cells. CiRA 国際シンポジウム 2013 年 3 月 1 1 日~1 2 日 京都

Yamauchi K, Nakatsuji N, Suemori H. Monitoring of the cardiac developmental process using a Nkx2-5^{eGFP} / MLV2^{vmCherry} human embryonic stem cell line. 12th ISSCR, 2014/6 /18~21, Canada

〔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：
出願年月日：
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

山内 香織 (Yamauchi Kaori)
京都大学再生医科学研究所 研究員
研究者番号：50503653

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：