

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893134

研究課題名(和文) Ifチャネルを指標としたヒトES細胞由来ペースメーカー細胞分取と拍動制御機構の解明

研究課題名(英文) Isolation and characterization of cardiac pacemaking cells derived from human embryonic 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) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト心臓のペースメーカー細胞は生体から直接採取することが不可能なため、全く研究が進んでいない。そこで本研究では、ヒトES細胞の心筋分化誘導系からHCN4遺伝子の発現を指標にペースメーカー細胞を分取する実験系を構築した。この系を用いて分取したヒトペースメーカー細胞は、自動能や自動能を生成するイオンチャネル電流を有し、マーカー遺伝子の発現やペースメーカー機能の検証から、生体のペースメーカー細胞とほぼ同等の性質を示すことが明らかとなった。以上より、本研究によって、新たなヒトペースメーカー細胞の分取解析系の確立に成功した。

研究成果の概要(英文)：The difficulty of preparation in vivo hampered us to analyze directly human sino-atrial pacemaker cells. Therefore we have established the experimental system for preparation of human pacemaker cells derived from human embryonic stem cells (hESCs). In this system, HCN4 positive cells were specifically visualized with CFP (cyan fluorescent protein). The sorted CFP positive cells from hESCs expressed HCN4 maker gene and displayed If current, which could resulted in the automaticity of those cells. Thus CFP positive cells from differentiating hESCs have the essentially same properties with sino-atrial pacemaker cells, including the gene expression profiles, electrophysiological properties. In addition, we targeted mCherry to the MLC2v locus, a good maker for ventricular cells, in the HCN4CFP-BAC hESCs by using CRIPER/CAS9 system. Currently we purified and analyzed HCN4 positive pacemaker cells and MLC2v positive ventricular cells to characterize the cardiac cells with human origin.

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細胞 HCN4 Ifチャネル 分化誘導 心筋細胞 自動能 可視化

### 1. 研究開始当初の背景

心臓の拍動調節の源である心臓ペースメーカー細胞は右心房の洞結節に存在し、自発性活動電位(自動能)をもつ特異な細胞である。

これまでのペースメーカー細胞に関する研究は、ヒト心臓からの細胞調整が極めて難しいため、小・中型動物の洞結節から解剖学的に取り出した自律拍動細胞や、培養細胞に目的のチャンネル遺伝子を異所性に発現させて行われてきた。加えて、近年は、ES(Embryonic Stem)細胞やiPS(induced Pluripotent Stem)細胞の心筋分化誘導系から単離した心筋細胞を用いた解析も行われている。しかしながら、これらの先行研究は、動物種や細胞種の異なる環境下での解析となること、拍動を指標とした心筋細胞の同定による作業心筋細胞の混入や生化学的解析に必要な細胞数の確保の困難さ、という問題がある。これらの問題により、自動能などペースメーカー機能を支える分子基盤の解明は遅れている。

ヒトES細胞やiPS細胞に由来する心筋細胞は、動物種や細胞種の問題を解決できる有力な実験材料である。しかし、現状、このような多能性幹細胞に由来する心筋細胞は、ペースメーカー細胞などの特殊心筋と、心房筋、心室筋などの作業心筋とが、混在しているという問題がある。申請者らは、マウスES細胞から分化誘導した心筋細胞集団の中に、自動能を持つペースメーカー細胞が存在することを見だし(Yano S et al, *Biomed. Res.*, 2009)、自動能の生成に重要なIf電流を構成するイオンチャンネル遺伝子であるHCN4 (Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated K<sup>+</sup> 4)の発現を指標とすることによって、マウスES細胞の心筋分化誘導系からペースメーカー細胞を分取できることを明らかにしている(Morikawa K et al, *PACE*, 2010)。本研究では、これまでの研究成果をヒトES細胞の分化誘導系に応用し、ヒトES細胞の心筋分化誘導系からペースメーカー細胞を分取する実験系を立案した。

### 2. 研究の目的

本研究では、ヒトES細胞を用いた心筋分化誘導系から、ペースメーカー細胞特異的マーカーであるHCN4遺伝子の発現に基づいたペースメーカー細胞の可視化と分取法の開発を行う。加えて、ペースメーカー細胞の性質解明には、他の心筋細胞、特に心室筋などの作業心筋との比較を行い、電気生理学的特性など、その差異を明らかにすることが重要である。そこで、ペースメーカー細胞と心室筋細胞との同時単離系を開発することとした。そして、分取したペースメーカー細胞と心室筋細胞の性状解析を目的とする。また、本研究によって初めて、ペースメーカー細胞の大量調整が可能となる。そこで、この特性を活かし、自動能の分子基盤を支えるIfチャンネルのサブユニット構造の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

ヒトペースメーカー細胞は、HCN4発現細胞で青色蛍光タンパク質(Cyan Fluorescent Protein :

CFP)が特異的に発現する改変ヒトES細胞株の樹立、およびその細胞株から心筋を分化誘導し、CFP(HCN4)陽性細胞を選択的に分取することによって行った。また、心室筋細胞は、分化した心筋細胞中から、MLC2v(Myosin Light Chain 2-ventricle : ミオシン軽鎖)陽性細胞を赤色蛍光タンパク質(mCherry)によって選択的に可視化することのできるヒトES細胞株を作製し、蛍光を指標に分取した。具体的には、まず、遺伝子改変技術を利用し、心筋拍動部位で特異的にCFP、mCherryを発現する株を複数樹立した。続いて、樹立した細胞株の心筋分化誘導を行い、蛍光の発現を観察するとともに、ペースメーカー細胞の分取を行い、分取した細胞の特性解析を行った。特性解析には、各陽性細胞の免疫染色、RT-PCRによる遺伝子発現解析、パッチクランプ法による電気生理学的特性解析、各種薬剤への応答性を検討した。加えて、*ex vivo*解析による、ペースメーカー機能の検証を行った。また、HCN4イオンチャンネルの構造解析のための、各種発現ベクターの作製を行い、免疫沈降などの条件決めを行った。

### 4. 研究成果

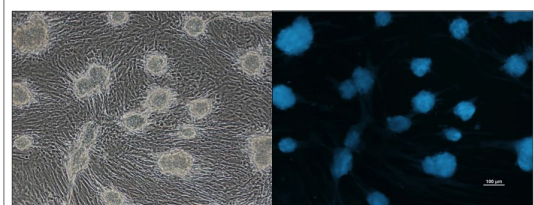
#### (1)ヒトペースメーカー細胞分取系の構築

ヒトES細胞の心筋分化誘導系から、ペースメーカー細胞を選択的に分取する実験系の構築を試みた。ヒトHCN4遺伝子を含むBACベクターを使用し、HCN4遺伝子のエクソン1にCFPをノックインしたBACベクターを作製した。続いて、作製したベクターをヒトES細胞(KhES-1細胞とKhES-3細胞)へ遺伝子導入し、導入株を樹立した。この細胞株に対して心筋分化誘導を行い、心筋拍動部位でのCFPの発現を指標に、目的細胞株のスクリーニングを行った。心筋分化誘導法はYamauchiらの論文(Yamauchi K et al, *Genes Cells*, 2010)を参考に、一部改変を加えた。この結果、分化誘導を行ったほぼ全ての細胞株で、心筋拍動部位でのCFP蛍光の発現を確認した。そこでこの中から、心筋拍動部位においてCFP蛍光の発現が最も強い株を用いて解析を行った。

#### (2)心筋分化誘導時のCFP蛍光の追跡

樹立した細胞株で心筋分化誘導を行い、CFP蛍光の推移を経時的に観察した。その結果、CFP蛍光は心筋拍動開始時の分化誘導後7日目後から、心筋拍動部位で特異的に発現することが明らかとなった(図1)。加えて、このCFP蛍光の発現は分化誘導後90日以降でも拍動部位で特異的に発現することが分かった。

図1:心筋拍動部位におけるCFP蛍光の発現



CFP 陽性細胞の割合も同時に測定すると、顕微鏡での観察と同様に、CFP 蛍光は拍動開始時期から測定され、その後分化誘導後 60 日目をピークに 85% 程度の細胞で発現が確認され、90 日目でも 45% 程度の細胞が CFP 陽性であることが明らかとなった。

### (3) 分取したヒトペースメーカー細胞の性状解析

CFP 陽性細胞を、セルソーターを用いて分取し、この細胞の性状解析を行った。まず、RT-PCR の結果から、CFP 陽性細胞は HCN1 や HCN4 などのペースメーカー細胞マーカー遺伝子を発現することが明らかとなった。続いて、免疫染色の結果から、心筋収縮タンパク質を発現することが判明した。さらにパッチクランプ法による電気生理学的解析では、この細胞からは自動能が検出され、If 電流など、ペースメーカー細胞に特異的な各種イオンチャンネル電流を測定できた(図 2)。

加えて、各種イオンチャンネル阻害剤を投与した。その結果、分取した CFP 陽性細胞は生体と同濃度でイオンチャンネル阻害剤への反応性を示した。これより、CFP 陽性細胞は、薬剤への生理的応答能を有することが明らかとなった。最後に、CFP 陽性細胞がペースメーカー細胞として他の心筋細胞を駆動するペースメーカー機能を有するかどうかを、Ca imaging 法を用いた *ex vivo* モデルで検証した。この結果、CFP 陽性細胞の電気信号が心房筋細胞へ伝播し、心房筋細胞との電気的結合が生じることが分かった。

以上の結果から、我々の実験系を用いて、機能を持つペースメーカー細胞が分取可能であることを見いだした。現在、この解析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。

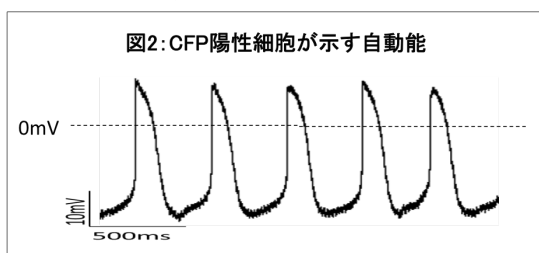


図2: CFP陽性細胞が示す自動能

### (4) 心室筋細胞との選別分取系の構築

ペースメーカー細胞と心室筋細胞の選別分取系の開発を行った。ペースメーカー細胞分取に用いたヒト ES 細胞株に対し、CRISPER/CAS9 によるゲノム編集法を用いて、MLC2v 遺伝子座に mCherry のノックインを試みた。PCR による判定から、クローニングしたヒト ES 細胞のコロニーのうち、約 20% のコロニーでノックインを確認した。続いて、樹立した細胞株の心筋分化誘導を行った。心筋分化初期では、CFP 蛍光のみが確認され、分化誘導後 20 日目前後から、mCherry 蛍光の発現がみられることが分かった。フローサイトメーターによる解析からは、CFP の単一陽性細胞、CFP と mCherry の二重陽性細胞、そしてごく少量の mCherry 単一陽性細胞の 3 種類の心筋細胞を選別分取できることが分かった。現在、これ

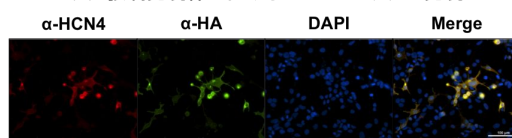
らの細胞について、遺伝子プロファイル、電気生理学的特性の解析を進めている。

### (5) If チャンネルサブユニット構造の解明

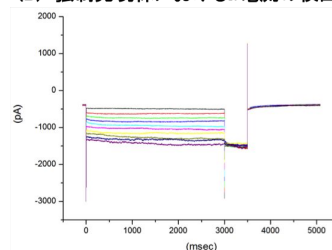
If チャンネルは、HCN4 を主要な構成要素とすることから、免疫沈降法によって HCN4 と相互作用する分子の同定を試みた。これまで、免疫沈降法の条件決めを行ってきた。Chick -Actin プロモーターの下流に、HA タグを付加した HCN4 の強制発現ベクターを作製し、過剰発現させた HEK293 細胞を樹立した。パッチクランプ法で解析すると、If 電流を検出でき、加えて、ウエスタンブロットング法や免疫染色によって、HCN4 を過剰発現していることが分かった(図 3)。この過剰発現株を用いて、HCN4 および結合タンパク質の免疫沈降実験のための、抗体の選定など各種パラメーターの条件決めを行っている。今回の研究で、ヒトペースメーカー細胞の分取が可能となったので、条件決めが終わり次第、ヒトペースメーカー細胞を用いた検証に移る予定である。

図3: HCN4強制発現細胞株の樹立

#### (A) 強制発現株におけるHCN4とHAタグの発現



#### (B) 強制発現株におけるIf電流の検出



## 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 4 件)

Sakata S, Kurata Y, Li P, Notsu T, Morikawa K, Miake J, Higaki K, Yamamoto Y, Yoshida A, Shirayoshi Y, Yamamoto K, Horie M, Ninomiya H, Kanzaki S, Hisatome I. Instability of KCNE1- D85N that Causes Long QT Syndrome: Stabilization by Verapamil. *Pacing and Clinical Electrophysiology*. 査読有. 37(7). 2014. 853-863. 2014. 10.1111/pace.12360

Endo R, Notsu T, Mishima M, Morikawa K, Li P, Ikeda N, Ninomiya H, Shirayoshi Y, Hisatome I. Bepiridil Suppresses Apoptosis in HL-1 Cardiac Atrial Myocytes Expressing Mutant E334K

cMyBPC. *Yonago Acta Medica*. 査読有. 56(4). 2013. 93-95 .

Iwai C, Li P, Kurata Y, Hoshikawa Y, Morikawa K, Maharani N, Higaki K, Sasano T, Notsu T, Ishido Y, Miake J, Yamamoto Y, Shirayoshi Y, Ninomiya H, Nakai A, Murata S, Yoshida A, Yamamoto K, Hiraoka M, Hisatome I. Hsp90 prevents interaction between CHIP and HERG proteins to facilitate maturation of wild-type and mutant HERG proteins. *Cardiovascular Research*. 査読有. 100(3). 2013. 520-528. 10.1093/cvr/cvt200

Bahrudin U, Ikeda N, Utami SB, Maharani N, Morikawa K, Li P, Sobirin MA, Hasegawa A, Sakata S, Endo R, Rifqi S, Shirayoshi Y, Yamamoto K, Ninomiya H, Hisatome I. Simultaneous treatment with azelnidipine and olmesartan inhibits apoptosis of HL-1 cardiac myocytes expressing E334k cMyBPC. *Drug Research*. 査読有. 63(10). 2013. 515-520. 10.1055/s-0003-1347188

(学会発表)(計 4 件)

Morikawa K, Nozaki D, Shirayoshi Y, Hisatome I. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF HCN4 POSITIVE CELLS DERIVED FROM HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS. *International Society for Stem Cell Research 13th Annual Meeting*. 2015 年 06 月 24 日～2015 年 06 月 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 回再生医療学フォーラム in 山陰(招待講演). 2015 年 05 月 25 日. 米子全日空ホテル, 鳥取

Shirayoshi Y, Morikawa K, Miake J, Hisatome I. HCN4 Positive Cells Derived from Pluripotent Stem Cells Show Automaticity and Pacemaking Ability. *The 79th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society*. 2015 年 04 月 24 日～2015 年 04 月 26 日. 大阪国際会議場, 大阪

Sogo T, Ichinose T, Morikawa K, Ikeda N, Shirayoshi Y, Kurata Y, Miake J, Yamamoto K, Yuasa S, Fukuda K, Hisatome I. Electrical Properties of Human iPS Cells- derived Cardiac Myocytes from the Patient with Long QT Syndrome Harboring a Novel Mutation of KCNQ1. 第 29 回 日本不整脈学会・第 31 回 日本心電学

会 合同学術大会. 2014 年 07 月 22 日～2014 年 07 月 25 日. 東京プリンスホテル, 東京

(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/>

鳥取大学医学部附属病院 次世代高度医療推進センター

<http://www2.hosp.med.tottori-u.ac.jp/departments/center/next-generation-advanced-medical-promotion-center/>

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