

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293313

研究課題名(和文) 高分化能TET1ヒトiPS細胞を用いた高効率心房筋分別法の確立

研究課題名(英文) Development of versatile fractionation method of human atrial myocytes from Tet-1 stabilized-human iPS cells

研究代表者

千本松 孝明 (Senbonmatsu, Takaaki)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：70216563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：汎用的ヒトiPS細胞誘導法確立の為、患者初代培養細胞を用いてiPS誘導を試みたが、購入株化細胞に比べて誘導効率は極めて悪く、特に患者心臓由来線維芽細胞にiPS細胞誘導は不可能であった。多くの患者残余検体組織から分別された線維芽細胞は、 $\alpha$ -SMA (smooth muscle actin) を高発現する筋線維芽細胞であり、この筋線維芽細胞を用いた場合、誘導は極めて困難であった。誘導がかりやすいように培養液を調整し、特に誘導初期にiPS細胞に必須なTGF- $\beta$  をOFFにしたところ、効率は良くないが、筋線維芽細胞からもiPS細胞誘導が確認された。このiPS細胞を用いて心筋細胞群誘導は成功した。

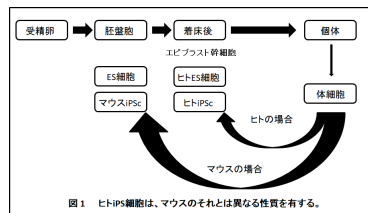
研究成果の概要(英文)：For development of a versatile human induced pluripotent stem cells (hiPSc) method, hiPSc induction was performed with patient's primary somatic cells that are fibroblasts from the skin and the heart. However, induction efficacy of hiPSc was very low compared with that of commercial available human fibroblasts. The fibroblasts from the remainder tissue after surgery highly expressed  $\alpha$ -SMA (smooth muscle actin), so-called these are myofibroblasts. Although using the myofibroblasts, it was very hard to create hiPSc, an initial medium without TGF- $\beta$  for hiPSc induction led to development of hiPSc successfully. But it was still low efficacy. Using the hiPSc from the myofibroblasts, we achieved the cardiomyocytes differentiation.

研究分野：心不全

キーワード：iPS細胞 心不全 再生

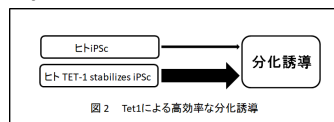
1. 研究開始当初の背景

ヒト iPS 細胞には分化能の劣る細胞 (epiblast stem cell) が混在することが判明しており、このためヒト iPS 細胞を高効率に分化誘導することは極めて困難である。胚盤胞内部細胞塊由来が ES 細胞であり、マウス iPS 細胞はこの性質が維持された状態で安定化し (この状態を naive state という) 未分化状態維持、三胚葉分化誘導が高効率にかかる。しかし、前述したようにヒト iPS 細胞は、着床後に相当する epiblast stem cell に近い状態で安定化するため (primed state という) ジャームライントランスミッションもされず、分化誘導効率も極めて悪く、これらがヒト iPS 細胞を用いた研究のスピードを押さえ込んでいる一因である (図 1)。分担研究者らは、脱メチル化酵素の 1 つである TET1 をノックダウンすると、その分化の



「登竜門」である epiblast 期への移行が阻害されることを発見しており、TET1 を発現しない ES 細胞は、epiblast 期への移行に際して観察されるはずの Dnmt3b の発現誘導が極めて起きにくくなったことを観察している。ヒト iPS 細胞でも TET1 は豊富に転写されているが、TET1 はヒト iPS 細胞では積極的に分解を受けており、タンパク質レベルでは検出できないことが判明している。つまり、ヒト iPS 細胞は TET1 を発現せぬまま維持されていたことになる。そこで易分解性を解除した TET1 をヒト iPS に強制発現させると、TET1 stabilized ヒト iPS 細胞は、現行ヒト iPS 細胞に比較して圧倒的に高効率で神経前駆体細胞になる。12 日間の誘導期間内で比較したところ、従来比 60 倍の効率向上を示した。そこで TET1 stabilized ヒト iPS 細胞の汎用性高効率分化能の検証として、高効率な心筋細胞誘導法 (中胚葉誘導) を確立し、それを基とした iPS 細胞由来心筋筋分別法を確立していく (図 2)。

心臓は 4 腔を持つ筋性臓器であり、酸素化血液

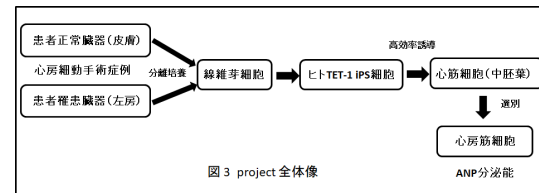


を全身に送り出す左心室は、壁厚がおよそ 1 cm 近くあり、重量も 200g 近くある容積の駆出器である。一方、心房は静脈還流を受け、心室に血液を効率よく送り出すが、左心室充満を助けるのに十分な収縮力と、陽性変力作用に対する反応性はあるものの、高い心腔内圧を発生する必要もなく壁厚はやすい。しかし、容積の感知器として心房利尿ペプチド (ANP) を生理的に分泌し、心血管系ホメオスタシスを維持す

る心血管内分泌臓器として極めて重要な機能を有している。心房細胞は、分泌顆粒に ANP を貯留し、容量負荷、pacing、運動負荷などによる心房への負荷に反応する regulated pathway を介して ANP を分泌する。現代循環器疾患の 2 大疾患の 1 つである心房細動と心不全はこれらが破綻する。その際、心室より脳性利尿ペプチド (BNP) が大量に分泌されるが、この分泌は病的であり、constitutively に分泌される。臨床現場でも内因性 BNP が大量分泌されている急性心不全患者に少量 human-ANP の投与が効果を示すことが報告されているが、これは神経体液因子を介したホメオスタシスの重要性を示している可能性がある。容積の駆出器たる左心室機能の改善に再生医療の注目は注がれがちであるが、TET1 stabilized ヒト iPS 細胞を介して高効率に、且つ加療に必要な十分な目的細胞である心房細胞が短期間に培養増殖が可能となれば (少なくとも心筋細胞よりも少量で済む)、将来の心不全加療、加えて洞調律改善困難心房細動患者の洞調律改善法の基礎一つとして期待が出来る。

2. 研究の目的 (図 3)

(1) **高効率中胚葉誘導の確立**: 外胚葉誘導 (神経前駆細胞誘導) で高効率誘導を示した TET1 stabilized ヒト iPS 細胞の汎用性分化誘導として中胚葉誘導 (心筋誘導) でも同様に高効率分化誘導を示すか検証をし、その誘導法を確率する。



(2) **患者臓器から TET1 stabilized ヒト iPS 細胞の培養系樹立**: 1) と同時に患者より分離培養した心房並びに皮膚由来線維芽細胞より、TET1 stabilized ヒト iPS 細胞の培養系を樹立する。

(3) **患者正常並びに罹患臓器由来 TET1 stabilized ヒト iPS 細胞の検証**: TET1 stabilized ヒト iPS 細胞からの高効率心筋細胞誘導確立後、患者正常皮膚並びに罹患心房由来の相違に伴う iPS 細胞品質の検証を行う。

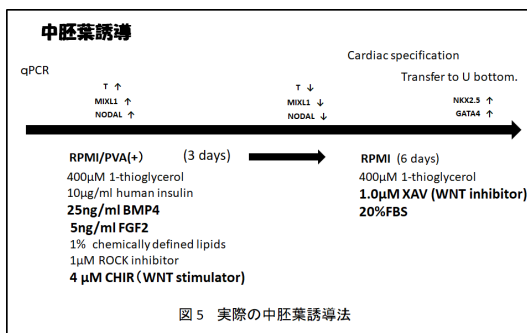
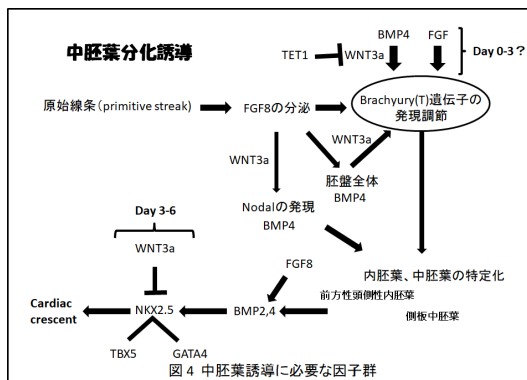
(4) **中胚葉誘導により分化した心臓細胞群の分離培養系の確立**: 誘導された心臓細胞群には、心筋細胞 (左室) 心房筋細胞、ペースメーカー細胞、伝導系細胞、支持細胞や血管系細胞などが混在する。特異的発現分子の抗体や表面マーカーとフローサイトメトリーを用いて心房筋分離培養の系を確立する。そのために同時に大量培養可能 (高効率であるはずなので) な系も樹立する。分離培養樹立後、圧負荷やアンジオテンシン II やカテコラミンなどの液性因子負荷による分泌能の確認を行う。この細胞を用

いてより ANP 分泌能を高めた、ANP-transgenic 心房細胞の作製も試みる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 高効率中胚葉誘導の確立:

分担研究者より供給される TET1 stabilized ヒト iPS 細胞を用いて高効率な心筋誘導法を確立する。基本的には、中胚葉誘導に必須な TGF- $\beta$  ファミリーの一員である BMP4 と線維芽細胞増殖因子 FGF そして WNT stimulator により誘導をかける。中胚葉誘導後の心筋特異的誘導の際には、逆に WNT は、NKX2.5 を抑制するため、WNT 刺激を抑制する必要がある。そのため中胚葉誘導後の心筋特異的誘導時には、WNT 抑制薬として XAV939 を約 6 日間使用し、心筋誘導を試みる。誘導は図に示した如く、qPCR により特異的な遺伝子の発現で確認するが、よりわかりやすくするために、V-bottom culture dish を用いて心筋塊を形成しやすくし、心筋収縮が見やすい環境を整える。誘導効率は、96 well V-bottom culture dish を用いて、96 wells の内、どれだけの well で心筋収縮並びに特異的遺伝子の発現が確認できるか検証を行う(図 4、5)。



#### (2)(3) 患者手術後残余検体組織から TET1stabilized ヒト iPS 細胞の培養系樹立並びに患者正常並びに罹患臓器由来 TET1stabilized ヒト iPS 細胞の検証 心房からの線維芽細胞分離培養:

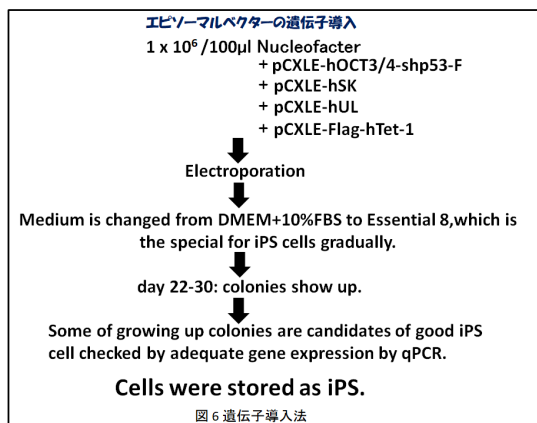
メイズ手術(心房細動外科手術)で切離剥離された左心耳組織を直ちに cold PBS(-)に浸漬し、乾かないようにしながら細切し、細胞培養皿に直接組織小片を接着させる(explant 法)。ケラチノサイトが増殖し、約 10 日程度で線維芽細胞が出現し、数代継代したところで凍結保存し iPS 細胞誘導用とする。培養液は DMEM+20%FBS に抗

生剤を添加したものを基本とする。

**皮膚からの線維芽細胞分離培養:** 手術で得られた患者皮膚組織(2x5mm、厚さ 2-3mm)を PBS(-)+ ペニシリン-ストレプトマイシン(それぞれ 100 $\mu$ g/ml)で組織を十分に洗う。1mm 角に細切した組織を explant 法で細胞培養皿に押し付けて貼るように置き、DMEM+20%FBS + 抗生剤培養液を加えて培養を開始し皮膚由来線維芽細胞を調整する。約 3 週間で継代し 5-6 継代で凍結保存し iPS 細胞誘導用とする。

#### iPS 細胞誘導:

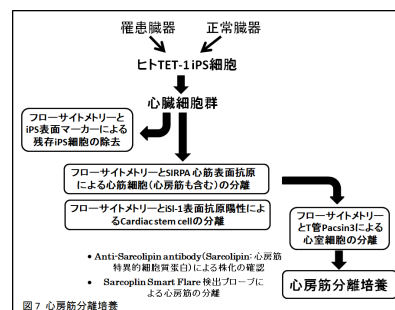
エピソーマルベクターを用いた遺伝子導入法で行う。エピソーマルベクターとは、EBNA1 タンパク質 oriP を介して宿主ゲノムに結合し、ゲノム非組み込みのまま娘細胞でも安定した遺伝子の発現が見込めるベクターである。Addgene 社より、iPS 細胞誘導用エピソーマルベクターを購入し、更に Flag-TET1 を組み込んだエピソーマルベクターを作製し、図 6 に示した如くエレクトロポレーション法を用いて導入を行う。約 1 ヶ月で iPS 細胞コロニーの出現を見込んだ。ただし、少なくとも皮膚由来と心房由来線維芽細胞は、増殖能も全く異なるため、それぞれ(もしくは患者ごとの)導入期間、培養液の変更は、modification が必要なると考えている。得られた iPS 細胞コロニーはピックアップし、株化するまで培養し、iPS 細胞特異的な遺伝子発現を qPCR を用いて確認し、直ちに中胚葉誘導をかけて分化効率を検証する(図 6)。



#### (4) 中胚葉誘導により分化した心臓細胞群の分離培養系の確立

中胚葉誘導細胞群(心臓細胞群)を図 7 の如く、フローサイトメトリーと SIRPA 心筋特異的

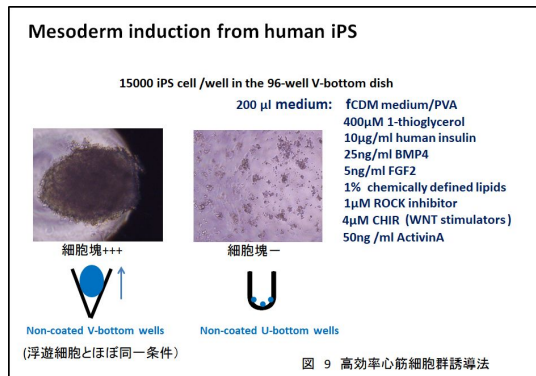
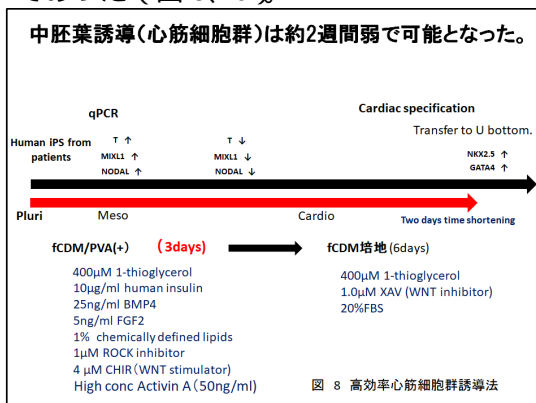
表面抗原に対する抗体を用いて、心筋細胞のみを分離する。



#### 4. 研究成果

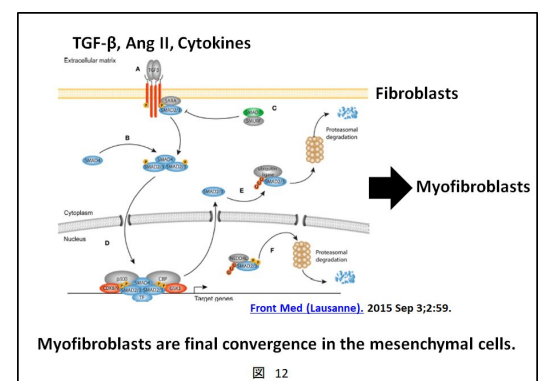
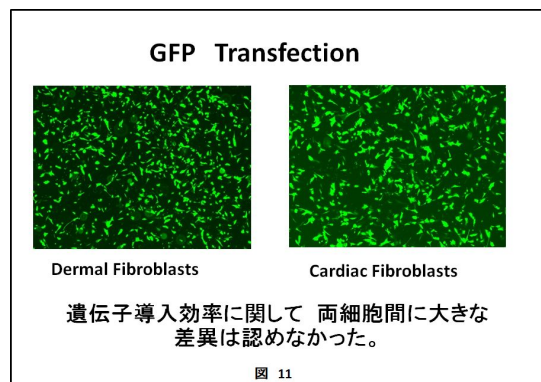
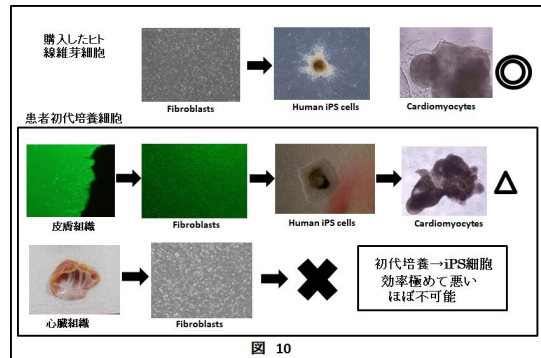
##### 高効率中胚葉誘導の確立：

図5に示した基本的な中胚葉誘導法を中心に改良を重ね、図8の如く高効率心臓細胞群誘導法を確立した。Raoらの論文にあるように、主たる誘導因子をBMP4、FGF2、Activin AそしてWNT stimulator (CHIR99021)とし、加えて細胞塊易形成としてROCK inhibitorを加えた(*Cell Stem Cell*. 2016 Mar 3;18(3):341-53.)。また与えられた環境の中で浮遊細胞により近い細胞培養環境として、低接着 Non-coated V-bottom wells と Poly vinyl alcohol (PVA)の添加(4 mg/ml)は必須であった。その結果誘導から約2週間弱にて心筋誘導 (beating, ETC)の確認が出来た。誘導効率は96-wellを用いて約94%の誘導効率であった(図8、9)。



**患者手術後残余検体組織からTET1stabilized ヒト iPS 細胞の培養系樹立：** 上述した方法によりメイズ手術の際に切離廃棄される左心耳と、同一患者でドレーン挿入部のトリミングの際破棄される一部皮膚組織から線維芽細胞を初代培養として分別培養し、それらにエピソーマルベクターに組み込まれた山中4因子を遺伝子し、宿主細胞の遺伝子改変が生じない方法(non-integration method)としてより高効率なヒト iPS 細胞の樹立(patient derived iPS 細胞)を目指した。しかし、ヒト iPS 細胞誘導において、患者初代培養間葉系細胞と株化された細胞(市販され、購入可能な細胞)では、その誘導効率において隔世の感があることは禁じ得ない結果となってしまった。購入した間葉系細胞を

用いてヒト iPS 細胞誘導を行った場合、京都 iPS 研究所より発表されたプロトコルに準拠した方法で、誘導はほぼ問題なく可能である。一方 患者由来初代培養間葉系細胞を用いた場合、皮膚由来であれば、その効率は購入したそれに比して極めて悪いが、比較的容易に iPS 細胞を誘導することは可能である。しかし、患者心臓由来線維芽細胞は、pCXLE-GFPを用いた遺伝子導入では、皮膚のそれに比べてほぼ同等の遺伝子導入効率を示すが、山中法やそれに準拠した方法では患者心臓由来線維芽細胞に iPS 細胞誘導は不可能であった(図10、11)。



病的組織として切離剥離された左心耳や高齢患者から得られた線維芽細胞は、α-smooth muscle actin (SMA)遺伝子を高発現している筋線維芽細胞が主体であり、その筋線維芽細胞は組織炎症により生じる間葉系収斂スポットであり、TGF-β, Ang II, サイトカインの刺激により産生される臓器線維化のキープレイヤーである(図12)。興味深いことにこの筋線維芽細胞からは、

iPS 細胞誘導が全くかからず、ほとんどの細胞が誘導後に増殖せず老化し、死細胞に至る。Ubil らは、心臓が障害を受けた際、cardiac fibroblasts の一部が、Mesenchymal-endothelial-transition(MET)を介して血管内皮細胞形成を介して血管新生に寄与し、他は筋線維芽細胞に変化することを発表した(Nature. 2014 Oct 30;514(7524):585-90.)。その中で注目になる結果は、筋線維芽細胞からは MET を介して内皮細胞は形成されないことにある(図 13)。何故ならば、間葉系細胞からの iPS 細胞誘導は、MET を介して誘導されることに他ならないからである。

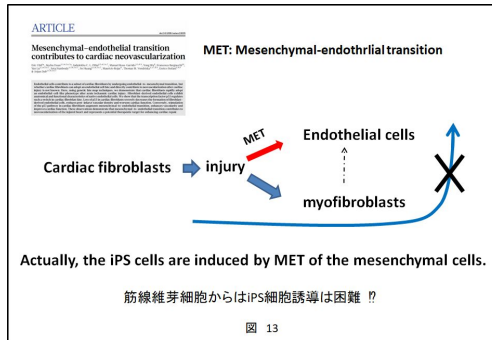


図 13

皮膚由来の線維芽細胞も継代を重ねると  $\alpha$ -SMA の発現が増加し、iPS 細胞誘導が困難となる。逆に購入したヒト心臓由来線維芽細胞は  $\alpha$ -SMA の発現は低く、iPS 細胞誘導が可能であることも観察されている(図 14)。即ち、筋線維芽細胞は、線維芽細胞と同様の増殖能を有しながら iPS 細胞誘導は極めて困難であるということになる。しかし、将来の臨床応用を考慮すると、筋線維芽細胞からの iPS 細胞誘導のブレークスルーは、高効率ヒト iPS 細胞誘導の道しるべになることは間違いない。

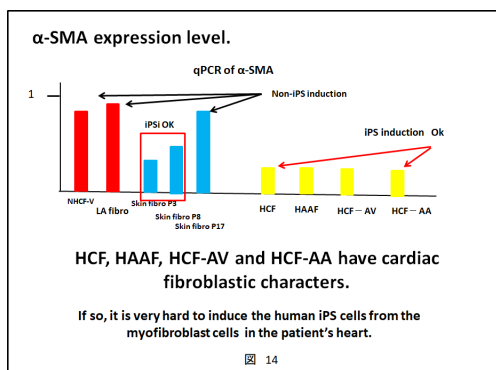


図 14

Cacchiarelli らは、モノクローナル化した second iPS 細胞を用いて、間葉系細胞に山中因子導入後に生じる遺伝子変化の詳細を Cell に発表した(Cell. 2015 Jul 16;162(2):412-24.)。その中で、遺伝子導入直後に生じる宿主細胞遺伝子変化は、間葉系主要遺伝子発現の減弱であった。筋線維芽細胞を用いた場合、その初期変化が極めて生じづらいことが観察された(図 15)。

我々は、iPS 細胞誘導時の培養液に必須因子として含まれる TGF- $\beta$  がその原因の 1 つであると推測した。上述したように TGF- $\beta$  は筋線維芽細胞の増殖促進作用を

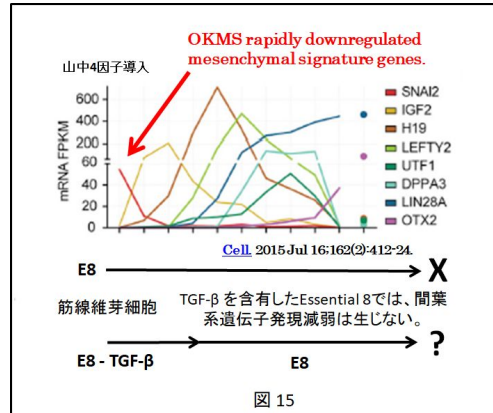


図 15

持つため、4 因子導入後の初期変化が抑えられている可能性が極めて高く、そこで初期培養液から TGF- $\beta$  を除き、さらに各種 TGF- $\beta$  阻害薬(汎用、選択的。選択的 ALK5 阻害剤 SB431542 は、OCT4 enhancing により誘導効率を高める報告がある。Nat Methods. (11):805-8, 2009) を加えて誘導初期の間葉系主要遺伝子群発現低下が生じる培養環境を構築し、筋線維芽細胞からの iPS 細胞誘導に成功した(投稿準備中)(図 16)。

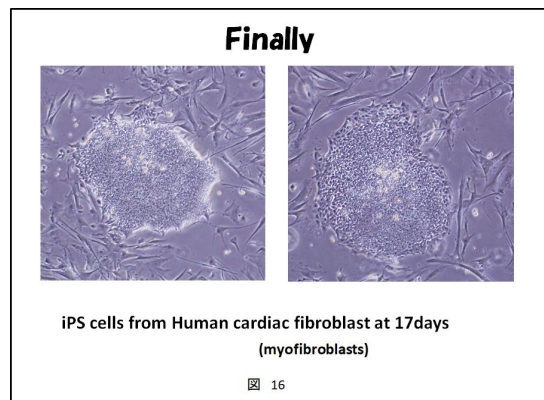


図 16

しかし、誘導が可能になったと言えども高効率にはまだまだ不十分であり、遺伝子導入法も含めて最適化された導入法確立のために更なる実験は必要である。

### 心臓細胞群の分離培養系の確立

残余検体組織から TET1stabilized ヒト iPS 細胞の培養系樹立に極めて多くの時間を費やしたために、中胚葉誘導以降の実験に十分な実験時間をとることは困難であった。我々は、高効率な心室筋、心房筋の分別法を確立し、化学作用すなわち制御された心房利尿ホルモン分泌能を有する心房筋細胞に着目している。しかし現在のところ、心房筋ならびに心室筋を高効率に分別する方法は存在しない。心筋細胞表面抗原 signal-regulatory protein alpha (SIRPA)

(Nat Biotechnol. 2011 Oct 23;29(11):1011-8.)を用いたフローサイトメトリーにより心筋を分別する論文が発表されたが、心房筋心室筋共にこの表面抗原を有しており、分別には有効ではない。今後は、miRNA, アプタマー等を用いて分別をここ見る予定である。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者 千本松孝明  
( Senbonmatsu Takaaki )  
埼玉医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70216563

(2)研究分担者 井口篤志  
( Iguchi Atsushi )  
埼玉医科大学・医学部・教授  
研究者番号：90222851

研究分担者 加藤英政  
( Kato Hidemasa )  
愛媛大学・医学部・准教授  
研究者番号：50292123

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )