

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24300145

研究課題名(和文) Hcn4ノックインマウスを使ったバイオペースメーカー細胞の高効率スクリーニング

研究課題名(英文) HCN4-luciferase knock-in mouse is a new tool for pacemaker cell reprogramming

研究代表者

鷹野 誠 (TAKANO, Makoto)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：30236252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、徐脈性不整脈に罹患し人工ペースメーカー植え込み術を受ける患者数は増加の一途である。これは自動能をもつ洞房結節ペースメーカー細胞の変性・脱落が原因であり、再生心筋による治療の可能性が注目を集めている。そこで洞房結節のペースメーカー細胞に特異的に発現するHCN4という分子の遺伝子座にホタルの発光蛋白質を組み込んだ遺伝子改変マウスを作成した。このマウスではペースメーカー細胞をホタルのように光らせることができる。この光を手がかりに、ペースメーカー型の再生心筋細胞を簡便かつ定量的にスクリーニングする方法を開発することができた。

研究成果の概要(英文)：As a next-generation therapy for bradyarrhythmia, development of biologically engineered pacemaker cells is anticipated. HCN4 channel is widely known as a specific molecular marker for the pacemaker cell of sinoatrial node. In order to visualize HCN4-expressing bio-pacemaker cell, we generated transgenic mouse, in which cDNA of firefly luciferase-GFP fusion protein was knocked in at HCN4 locus (HCN4+/Luc). 15 min after intraperitoneal injection of 50 mg/kg luciferin, we could successfully visualize HCN4-expressing myocyte in SAN area. Weak but significant luminescence of cultured neonatal ventricular myocyte (NVM) could be also detected using LAS4000 system. However, lentiviral transfection of Tbx3 or Tbx18 into NVM failed to increase HCN4-derived luminescence.

研究分野：生理学

キーワード：洞房結節 ペースメーカー細胞 イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

近年、完全房室ブロックや洞機能不全症候群などの徐脈性不整脈に罹患する患者が増加している。徐脈性不整脈の主たる原因は洞房結節や房室結節の変性・脱落であり、現在のところ機械式ペースメーカーの植え込み術が唯一の治療法である。一方、これらの組織は数万個の自動能をもつ特殊心筋から構成されているのみであり、再生心筋による細胞治療のターゲットとして注目を集めている。そのため洞房結節に特異的に発現する HCN4 チャネルを指標として、ペースメーカー細胞型再生心筋を作成することが試みられている。

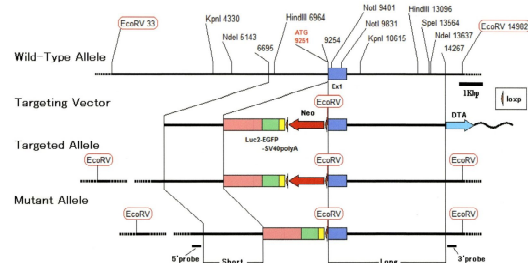
2. 研究の目的

そこで本研究では HCN4 の発現誘導を定量的に評価するために、HCN4 遺伝子座に可視化分子をノックインしたマウスを作成することを第 1 の目的とした。一般的には可視化分子として GFP 等の蛍光蛋白質を使用することが多いが、蛍光蛋白質は発現量が低い場合には、細胞が持つ自家蛍光との区別が非常に困難である。そこで本研究では背景シグナルが皆無である化学発光プローブを利用することとし、すでに *in vivo* イメージングでの実績があるホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を HCN4 遺伝子座にノックインしたマウスを作成することをめざした。

3. 研究の方法

(1) ターゲティングベクターの構築

クロンテック社のプロモータアッセイ用ベクターのホタル・ルシフェラーゼ cDNA の C 端に、EGFP cDNA を融合した cDNA [Luc-EGFP-SV40 polyA] を作成した。その直後にネオマイシン耐性遺伝子を loxP で挟んだ [loxP-Neo-loxP] カセットを連結した。Short arm (~2.6kb) と long arm (~5kb) の間に HCN4 遺伝子の開始コドンに合わせ [Luc-EGFP-SV40 polyA] + [loxP-Neo-loxP] を挿入したコンストラクトを構築した。これにより HCN4 をノックアウトすると同時に、HCN4 プロモーター駆動下に Luc-EGFP 融合蛋白質を発現させることが可能である。



(2) ノックインマウスの作成

上記のターゲティングベクターをエレクトロポレーション法により C57BL/6 由来 ES 細胞へ遺伝子導入してセレクションを行った結果、72 クローンの ES 細胞を得た。これらの細胞から、PCR genotyping により Luc-EGFP-SV40 polyA 陽性と判定される 8 つの ES 細胞クローンを得た。さらに short arm もしくは long arm の外側で切断する制限酵素 (5'側=StuI、3'側=EcoRV) を使ってゲノムを消化し、5'側および 3'側で作成したプローブを用いて wild type allele および targeted allele の二本のバンドに分かれる条件で検出を行い、相同組み換えを確認した。その結果、7 つの陽性クローンを得ることができた。これらの KI 陽性 ES 細胞を受精卵にインジェクションし、キメラマウスを作成した。キメラ率 70%~95%のキメラマウス 6 匹を得ることができ、そのうちの 2 匹を使って 2 系統の F1 ヘテロマウスを作成することに成功した。このうち 1 系統のマウスを、CAG promoter 駆動下に cre recombinase を全身で発現するトランスジェニックマウスと交配させ、neomycin 耐性遺伝子配列を除去し、HCN4⁺/LucEGFP マウスを作成した。

4. 研究成果

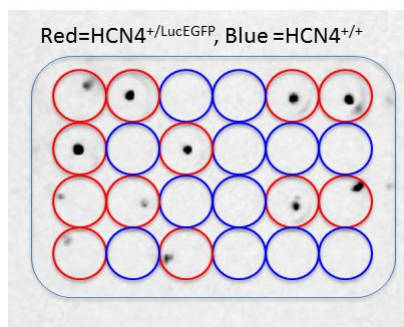
(1) HCN4⁺/LucEGFP のイメージング

これまでに HCN4 は心臓洞房結節以外に嗅神経に発現していることが報告されている。そこでこれらの HCN4 の生理的発現部位においてルシフェリン・ルシフェラーゼの化学発光やイソフルレン麻酔下に 50 mg/kg のルシフェリンを腹腔内投与し、15 分後に IVIS Xenogen にて撮影を行ったところ、体表面に近い嗅神経に由来する化学発光を短時間の露光で可視化することに成功した。一方、洞房結節のシグナルを体外から検出することは不可能だった。透過性の高い長波長の発光基質 (アカルミネ) をマウスに投与しても、困難であった。また GFP 蛍光により、HCN4 発現部位を *in vivo* で可視することは不可能であった。

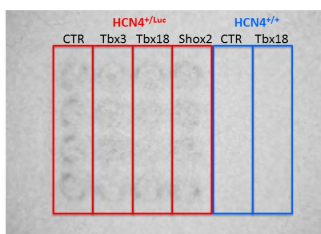
そこで深麻酔下にマウスに 50mg/kg のルシフェリンを投与したうち心臓を摘出した。洞房結節領域をトリミングし、10 uM プレブスタチンを灌流して拍動を停止させ、EM-CCD カメラを使用して *ex vivo* で撮影した。その結果、短時間の露光で洞房結節領域の HCN4 発現部位の発光シグナルを容易に可視化することができた。しかしながら HCN4 発現領域の GFP 蛍光は周囲の自家蛍光と区別することが不可能であった。

(2) HCN4^{+/LucEGFP} の心筋培養と、洞房結節特異的な転写因子の遺伝子導入

HCN4^{+/LucEGFP} 同士を交配して得られた新生児マウスから心臓を摘出し、24 ウェルプレートに分注した 50ug/ml ルシフェリンを含む PBS 中で 15 分静置したのち、LAS4000 で化学発光を検出した。



上図のうち、強いシグナルが認められるウェルは、洞房結節/心房を含む心臓全体が、やや弱いシグナルのウェルは心房を除去した心臓の一部が入っている。これらの組織から心室の下 2/3 を採取し、コラゲナーゼ処理により心筋細胞を単離して 24 ウェルプレートで 1 ウェルあたり 1×10^5 の密度で培養した。線維芽細胞と内皮細胞はミルテニー社の抗体磁気ビーズを使って除去した。



培養開始 12 時間後に、洞房結節特異的な転写因子のうち Tbx3、Tbx18、Shox2 を、アデノウイルスベクターを使って遺伝子導入した。これらの転写因子の C 端には pmOrange 蛍光蛋白質を融合し、感染効率を確認した。48 時間後に培地を 50 ug/ml ルシフェリンを含む PBS に交換し、発光シグナル強度を指標として、HCN4 の発現量を LAS4000 で確認したが、顕著な増加は認められなかった。

Bakker ら (Cardiovasc Res 2012) および Kapoor ら (Nat Biotechnol 2013) は、それぞれ Tbx3 や Tbx18 によって HCN4 の発現量が上昇することを Western blot によって報告しているが、その上昇量は顕著とは言い難い。HCN4 発現の検出方法に関しては、我々の実験系のほうが感度も定量性もはるかに鋭敏かつ正確である。おそらく洞房結節特異的な転写因子を心室筋に異所性に発現させるだけではペースメーカー細胞への完全な形質転換は不可能で、心室筋に発現している NRSF

などの抑制性転写因子のノックダウンを同時に行うことが必要ではないかと思われた。

(3) HCN4^{+/LucEGFP} からの iPS 細胞作成

続いてペースメーカー型再生心筋を作成するために、受精後 15 日目の HCN4^{+/LucEGFP} 胎児から線維芽細胞を培養し、山中 4 因子を遺伝子導入し、iPS 細胞を作成することを試みた。しかしながら形質転換の効率が悪く、薬剤耐性によって iPS 細胞を選択することが必要となった。そのため理研より Nanog 遺伝子座に puromycin 耐性遺伝子をノックインしたマウスを購入し、HCN4^{+/LucEGFP} と交配した上でダブルノックインマウス胎児から線維芽細胞を培養し、iPS 細胞を作成して心筋分化誘導を試みた。しかしながらこれまでのところ、心筋細胞を十分にエンリッチすることができていない。線維芽細胞から心筋へ直接再プログラミングすることも試みたが、形質転換の効率が低く、断念せざるを得なかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

1. Itoh M, Ishihara K, Nakashima N, Takano M: The hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels contain multiple S-palmitoylation sites. *J Physiol Sci*; 66:241-248, 2016. 査読有
doi:10.1007/s12576-015-0420-5
2. Nakahira K, Oshita K, Itoh M, Takano M, Sakaguchi Y, Ishihara K: Clinical concentrations of local anesthetics bupivacaine and lidocaine differentially inhibit human Kir2.x inward rectifier K⁺ channels. *Anesth Analg*; 122:1038-1047, 2016. 査読有.
doi:10.1213/ANE.0000000000001137
3. Murata Y, Yasaka T, Takano M, Ishihara K: Neuronal and glial expression of inward rectifier potassium channel subunits Kir2.x in rat dorsal root ganglion and spinal cord. *Neurosci Lett*; 617:59-65, 2016. 査読有
doi:10.1016/j.neulet.2016.02.007
4. Oba T, Yasukawa H, Nagata T, Kyogoku S, Minami T, Nishihara M, Ohshima H, Mawatari K, Nohara S, Takahashi J, Sugi Y, Igata S, Iwamoto Y, Kai H, Matsuoka H, Takano M, Aoki H, Fukumoto Y, Imaizumi T: Renal nerve-mediated erythropoietin release confers cardioprotection during remote ischemic preconditioning. *Circ J*; 79:1557-1567, 2015. 査読有

doi:10.1253/circj.CJ-14-1171

5. Harrell DT, Ashihara T, Ishikawa T, Tominaga I, Mazzanti A, Takahashi K, Oginosawa Y, Abe H, Maemura K, Sumitomo N, Uno K, Takano M, Priori SG, Makita N: Genotype-dependent differences in age of manifestation and arrhythmia complications in short QT syndrome. *Int J Cardiol*; 190:393-402, 2015. 査読有
doi:10.1016/j.ijcard.2015.04.090
 6. 鷹野 誠: ペースメーカーチャネル (HCN)の病態生理. *臨と研*; 92:134-137, 2015. 査読無
 7. Hara M, Takahashi T, Mitsumasu C, Igata S, Takano M, Minami T, Yasukawa H, Okayama S, Nakamura K, Okabe Y, Tanaka E, Takemura G, Kosai K, Yamashita Y, Matsuishi T: Disturbance of cardiac gene expression and cardiomyocyte structure predisposes *Mecp2*-null mice to arrhythmias. *Sci Rep*; 5:11204, 2015. 査読有
DOI:10.1038/srep11204
 8. Oshita K, Itoh M, Hirashima S, Kuwabara Y, Ishihara K, Kuwahara K, Nakao K, Kimura T, Nakamura K, Ushijima K, Takano M: Ectopic automaticity induced in ventricular myocytes by transgenic overexpression of HCN2. *J Mol Cell Cardiol*; 80:81-89, 2015. 査読有
doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.12.019
 9. Saito Y, Nakamura K, Yoshida M, Sugiyama H, Ohe T, Kurokawa J, Furukawa T, Takano M, Nagase S, Morita H, Kusano KF, Ito H: Enhancement of spontaneous activity by HCN4 overexpression in mouse embryonic stem cell-derived cardiomyocytes - a possible biological pacemaker. *PLoS One*; 10:e0138193, 2015. 査読有
doi:10.1371/journal.pone.0138193
 10. Igata S, Hayashi T, Itoh M, Akasu T, Takano M, Ishimatsu M: Persistent α_1 -adrenergic receptor function in the nucleus locus coeruleus causes hyperexcitability in AD/HD model rats. *J Neurophysiol*; 111:777-786, 2014. 査読有
doi:10.1152/jn.01103.2012
 11. Kuwabara Y, Kuwahara K, Takano M, Kinoshita H, Arai Y, Yasuno S, Nakagawa Y, Igata S, Usami S, Minami T, Yamada Y, Nakao K, Yamada C, Shibata J, Nishikimi T, Ueshima K, Nakao K: Increased expression of HCN channels in the ventricular myocardium contributes to enhanced arrhythmicity in mouse failing hearts. *J Am Heart Assoc*; 2:e000150, 2013. 査読有
doi:10.1161/JAHA.113.000150
 12. 鷹野 誠: 過分極誘発陽イオンチャネルの発現制御と病態生理. *久留米医学会誌*; 75:173-179, 2012. 査読無
 13. Okamoto Y, Takano M, Ohba T, Ono K: Arrhythmogenic coupling between the Na^+ - Ca^{2+} exchanger and inositol 1,4,5-triphosphate receptor in rat pulmonary vein cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*; 52:988-997, 2012. 査読有
doi:10.1016/j.yjmcc.2012.01.007
- [学会発表](計47件、一部を抜粋)
1. Takeya M, Hashitani H, Hayashi T, Nakamura K, Takano M: Role of mucosa in generating spontaneous activity in the guinea pig seminal vesicle. The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 22, 2016, Sapporo Convention Center (札幌)
 2. Ishihara K, Itoh M, Igata S, Takano M: Revisiting K^+ dependence of conductance and gating of strong inward rectifier K^+ channels. The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 24, 2016, Sapporo Convention Center (札幌)
 3. Kozasa Y, Takeya M, Nakashima N, Ushijima K, Takano M: The role of pacemaker channel HCN4 against bradycardic response. The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 22, 2016, Sapporo Convention Center (札幌)
 4. Nakashima N, Takano M: Visualization of HCN4-expressing neurons with GFP using *Tet*-expression system. The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 23, 2016, Sapporo Convention Center (札幌)
 5. Takano M, Kozasa Y, Takeya M, Ohshita K, Ito M, Ishihara K, Nakashima N: Controversy still goes on; lessons from HCN4 knock-out mice. The Joint Meeting of the 30th Annual Meeting of the Japanese

- Heart Rhythm Society and the 32nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Society of Electrocardiology, July 29, 2015, Kyoto International Conference Center (京都)
6. Itoh M, Ishihara K, Takano M: Zdhhc3/7, the members of protein-palmitoylation enzymes, inhibit the current amplitude of HCN2 channel. The 120th Annual Meeting of the Japanese Association Anatomists, the 92nd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 21, 2015, Kobe Convention Center (神戸)
 7. Yanagi-Ishihara K, Itoh M, Takano M: Mechanism of the complete block of the Kir2.1 inward rectifier K⁺ channel under the external K⁺-free condition. The 120th Annual Meeting of the Japanese Association Anatomists, the 92nd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 21, 2015, Kobe Convention Center (神戸)
 8. Kozasa Y, Ohshita K, Nakashima N, Ushijima K, Takano M: Luminescence imaging of HCN4 expression and phenotypic analysis of HCN4 TET-off mouse. The 120th Annual Meeting of the Japanese Association Anatomists, the 92nd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 22, 2015, Kobe Convention Center (神戸)
 9. Takeya M, Hayashi T, Nakamura K, Takano M: Epithelium-dependent periodical excitation in response to stretch of guinea pig seminal vesicle. The 120th Annual Meeting of the Japanese Association Anatomists, the 92nd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 22, 2015, Kobe Convention Center (神戸)
 10. Murata Y, Honda Y, Yasaka T, Takano M, Masuko S, Ishihara K: Differential expression of Kir2.x inward rectifier K⁺ channels in neurons and glial cells in rat dorsal root ganglion and spinal cord. The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Neuroscience 2014), September 11, 2014, Pacifico Yokohama (横浜)
 11. Kuwabara Y, Kuwahara K, Takano M, Kinoshita H, Arai Y, Yasuno S, Nakagawa Y, Igata S, Usami S, Minami T, Yamada Y, Nakao K, Yamada C, Shibata J, Nishikimi T, Ueshima K, Nakao K: Increased expression of HCN channels in the ventricular myocardium contributes to enhanced arrhythmicity in mouse failing hearts. The Joint Congress of the 29th Annual Meeting of the Japanese Heart Rhythm Society and the 31st Annual Scientific Session of the Japanese Society of Electrocardiology, July 23, 2014, Prince Park Tower Tokyo (東京)
 12. Hara M, Takahashi T, Mitsumasu C, Igata S, Takano M, Okabe Y, Tanaka E, Matsuishi T: Analysis of cardiac arrhythmias and gene expression in MeCP2-null Mouse. 13th Rett Syndrome Symposium, June 24-26, 2014, Westfields Marriott Washington Dulles (Chantilly, USA)
 13. Ishihara K, Itoh M, Igata S, Takano M: Functional consequences of a gain-of-function mutation in the Kir2.1 inward rectifier K⁺ channel associated with short QT syndrome. The 91st Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 16, 2014, Kagoshima University Korimoto Campus (鹿児島)
 14. Itoh M, Takano M: Identification of palmitoylation enzymes for the HCN2 channel. The 91st Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 16, 2014, Kagoshima University Korimoto Campus (鹿児島)
 15. Ohshita K, Itoh M, Yanagi(Ishihara) K, Kuwabara Y, kuK, Ushijima K, Takano M: Induced automaticity in ventricular myocytes from transgenic mice overexpressing HCN2. The 91st Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 16, 2014, Kagoshima University Korimoto Campus (鹿児島)
 16. Takeya M, Itoh M, Ishihara K, Hayashi T, Nakamura K, Takano M: Epithelium of seminal vesicle modulates neural activity dependent contraction and originates stretch-sensitive contraction. The 91st Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 16, 2014, Kagoshima University Korimoto Campus (鹿児島)
 17. Takano M, Ohshita K, Ito M, Ishihara K, Kuwahara K: Pathophysiological roles of HCN channel family in the heart. The 91st

Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 16, 2014, Kagoshima University Korimoto Campus (鹿児島)

18. Oshita K, Igata S, Kuwabara Y, Kuwahara K, Ushijima K, Takano M: Induced automaticity in the ventricular myocytes of transgenic mouse overexpressing HCN2. IUPS 2013, July 23, 2013, International Convention Centre (Birmingham, UK)
19. Itoh M, Takano M: Identification of the palmitoylation sites of HCN2 channel. The 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 27, 2013, Tower Hall Funabori (東京)
20. Oshita K, Igata S, Kuwabara Y, Kuwahara K, Ushijima K, Takano M: Isoproterenol-induced spontaneous action potentials in the cardiac myocytes of transgenic mouse overexpressing HCN2. The 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 27, 2013, Tower Hall Funabori (東京)
21. Takeya M, Hayashi T, Nakamura K, Takano M: Epithelium of seminal vesicle confers stretch sensitivity and modulates noradrenaline-induced contraction. The 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 29, 2013, Tower Hall Funabori (東京)
22. Itoh M, Takano M: S-palmitoylation regulates the HCN channels. The 85th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, December 15, 2012, Fukuoka International Congress Center (福岡)

〔図書〕(計 1 件)

鷹野 誠: 『不整脈学』. 編集 井上 博・村川裕二, 南江堂(東京); 29-31, 2012.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

久留米大学医学部生理学講座ホームページ

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/physiol2/>

久留米大学研究者紹介

<http://research.kurume-u.ac.jp/data.php?scode=81615>

632890988

6 . 研究組織

(1)研究代表者:

鷹野 誠 (TAKANO, Makoto)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号: 30236252

(2)研究分担者

伊藤政之 (ITOH, Masayuki)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 20442535

武谷三恵 (TAKEYA, Mitsue)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号: 30289433

(3)連携研究者

山下 潤 (YAMASHITA, Jun)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号: 50335288

桑原宏一郎 (KUWAHARA, Koichiro)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号: 30402877