

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08551

研究課題名(和文) iPSC由来心筋細胞を用いた心機能と病態に関する新規遺伝子の探索と機能解析

研究課題名(英文) Analysis of novel genes involved in cardiac function using iPSC-derived cardiomyocytes

研究代表者

若林 繁夫 (Wakabayashi, Shigeo)

大阪医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：70158583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：人工多能性幹細胞(iPSCs)はあらゆる臓器の細胞に分化できるという観点から医療の分野で期待されている。しかし、分化させた後で残存する未分化なiPSCsがガン化する可能性がある。今回、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体(NHE1)という膜蛋白質をiPSCsで高発現すると、細胞内pH上昇が引き金になってrhoキナーゼの異常な活性化が起こり、細胞死が起こることが判明した。また、同様な機能を持つ低分子であるNa<sup>+</sup>イオノフォア(モネンシン)もiPSCsを特異的に死滅させることができることが判明し、未分化なiPSCsを簡単な操作で死滅除去できると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、学術的には大変意義のある研究である。細胞骨格の維持や細胞の収縮に関与するとして知られるrhoキナーゼ、ROCKが従来考えられていなかった”細胞内pHの上昇”という新しいシグナルによって活性化されること、また、その現象が未分化なiPSCsでのみ起こり、その細胞死をもたらすことが明らかになった。社会的には、iPSCsを再生医療へ応用する際、分化せずに残ってしまうiPSCsがガン化してしまうという危険性があった。本研究で、NHE1と同様な機能を持つ低分子モネンシンはiPSCs特異的に死滅させることが判明し、簡単な操作でiPSCsを死滅除去できる方法論へと応用可能である。

研究成果の概要(英文)：Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are expected in the field of the regenerative medicine from the point of view which can differentiate into cells of all organs. However, after making them differentiate, there is a serious possibility that undifferentiated remaining iPSCs become cancer. In this research, we found that overexpression of the plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE1) induces the cell death of iPSCs. We found that cell death occurs through strong activation of rho kinase ROCK caused by a local intracellular pH rise triggered by NHE1. Analogy to this, we also found that Na<sup>+</sup>-ionophore monensin which is a small compound with similar function as NHE1, specifically killed iPSCs. This study provides a new simple procedure through which to eliminate the iPSCs that remain after differentiation.

研究分野：分子細胞生理学

キーワード：iPS細胞 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体 NHE1 rhoキナーゼ 細胞死 細胞運動 ネクロ シス 細胞内pH

## 研究成果 (2017年4月~2020年3月)

### 1. 研究開始当初の背景

心筋細胞の収縮・弛緩は興奮収縮連関 (E-C カップリング) と呼ばれる筋小胞体を中心とした  $Ca^{2+}$  サイクルによって起こる。 $Ca^{2+}$  はまた心肥大・心不全の病態に決定的に重要な役割をすることが判明している。しかし、心筋の拍動・収縮および疾患に関連する多くの遺伝子の機能が研究されずに放置されている。本研究では、ゲノム編集 (CRISPR/Cas9) 技術を用いて、機能未知の遺伝子 (既知の遺伝子も含む) を人工多能性幹細胞 (iPSCs) でノックアウトしたのちに心筋細胞に分化誘導し、機能解析を行う。この解析によって、これまで研究されていなかった心臓の拍動・収縮・病態に関与する重要な遺伝子を見出し、遺伝子の新しい機能を発見することを目的とする。

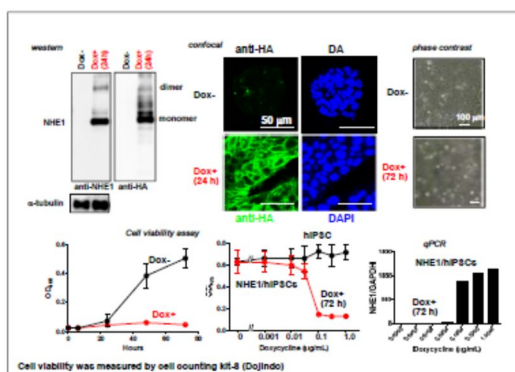
### 2. 研究の目的

当初の目的としては、ゲノム編集 (CRISPR/Cas9) 技術を用いて、機能未知の遺伝子 (既知の遺伝子も含む) を人工多能性幹細胞 (iPSCs) でノックアウトしたのちに心筋細胞に分化誘導し、機能解析を行い、心臓の拍動・収縮・病態に関与する重要な遺伝子を見出し、遺伝子の新しい機能を発見することであった。ところが、第1年目の研究において、iPSCs に細胞内 pH、 $Na^+$  濃度調節に重要な膜蛋白質である  $Na^+/H^+$  交換輸送体 (NHE1) を高発現したところ、予想に反して、iPSCs 細胞だけが死滅してしまうことが判明した。そこで、この予期しない興味深い現象について、そのメカニズムを明らかにすることを新たな目標とした。iPSCs から分化した細胞あるいは組織を再生医療の分野で利用する場合、分化せずに残る iPSCs がガン化する可能性があり、本研究はそのような iPSCs を簡単に除去できる方法論の開発につながることを期待される。

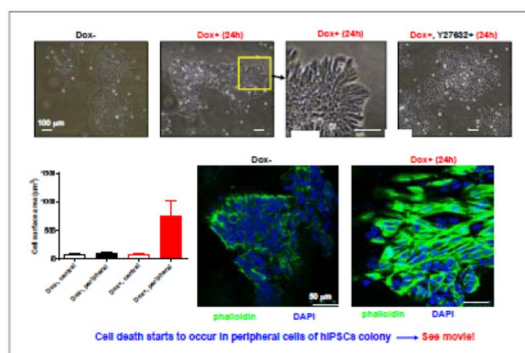
### 3. 研究の方法

細胞外ドメインに抗体検出用の HA タグを持つ NHE1 の遺伝子を組み込んだベクターをヒト iPSCs にトランスフェクトし、薬剤を用いて NHE1 を過剰発現する安定株を作成した。NHE1 の過剰発現は、Doxycycline (Dox) による誘導によって起こるようにした。細胞生存率は Cell count kit (同仁)、細胞死は Realtime-Glo kit (Promega) によって測定した。細胞内 pH 測定は carboxy-SNARF1 の蛍光 Ratio 測光によって行った。ウエスタンブロット、免疫染色、定量 PCR は常法に従って、行った。

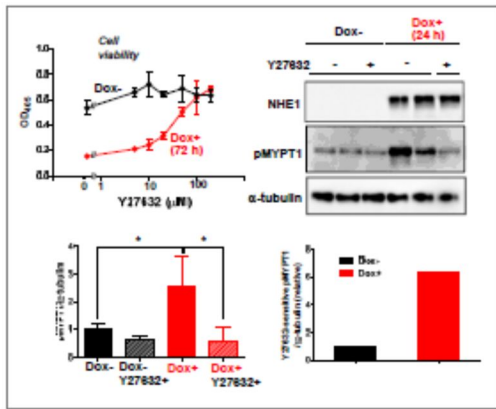
### 4. 研究成果



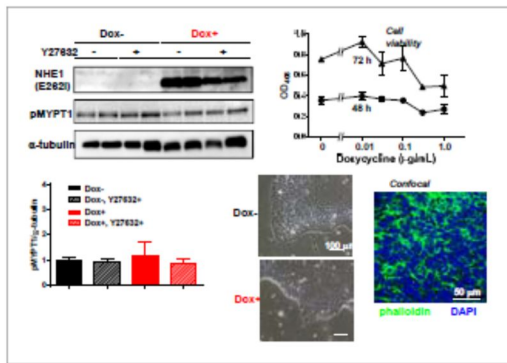
安定発現 iPSCs 株を樹立したうえで Doxycycline により NHE1 過剰発現を行うと、細胞増殖は停止し、72 時間以内に細胞はネクrosisにより死滅した。



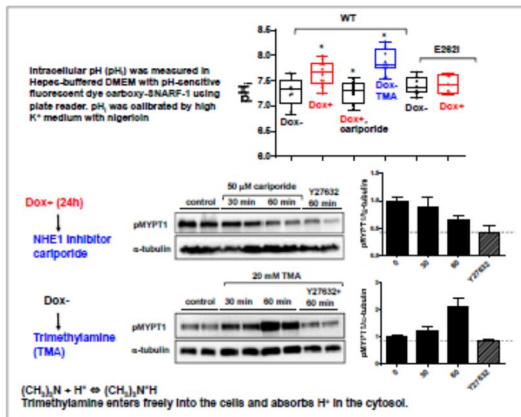
NHE1 過剰発現を行うと、コロニー辺縁部において細胞の異常な伸長・膨張およびストレスファイバーの著明な形成が起こり、コロニー辺縁部において優先的な細胞死が起こった。



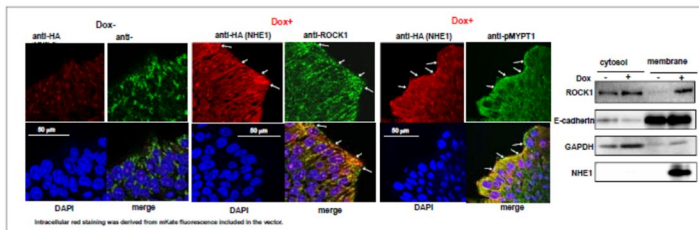
NHE1 過剰発現によって Rho 下流のキナーゼ ROCK の持続的活性化をもたらし、細胞死は ROCK 阻害剤 Y27632 によって阻害された。従って、NHE1 による細胞死は ROCK の異常な活性化によって起こることを示唆する。



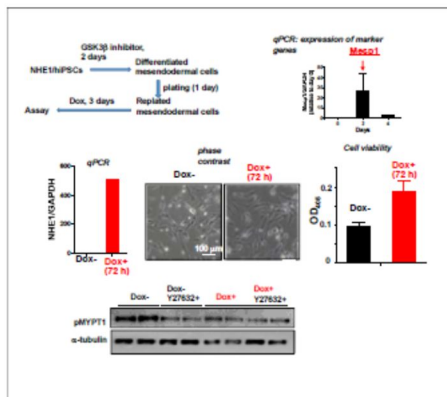
一連の現象は、活性を持たない NHE1 変異体では起きなかった。従って、NHE1 による ROCK の活性化と細胞死には、NHE1 活性が必要であることを示す。



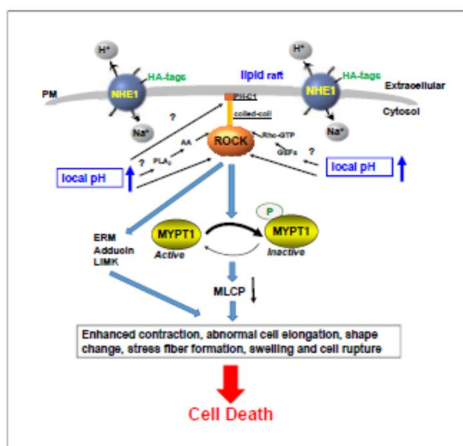
NHE1 による ROCK の活性化は NHE1 阻害剤で抑制され、NHE1 がいない場合でも、ROCK は人工的な細胞質アルカリ化によっても活性化されるので、NHE1 による ROCK の活性化は、NHE1 活性に基づく細胞内 pH の増加によって起こることが示唆された。



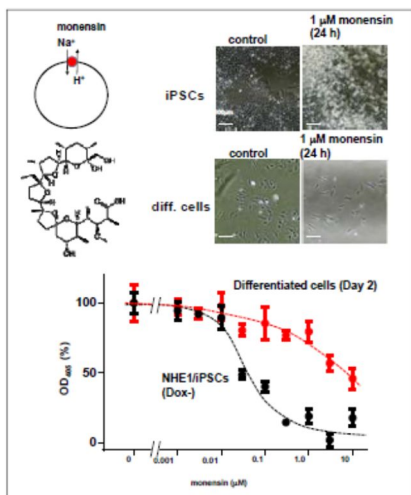
ROCK とその基質であるリン酸化 MYPT1 は NHE1 過剰発現に伴い細胞膜に集積したので、ROCK の活性化は NHE1 が発現する膜近傍で起こることがわかった。おそらく NHE1 付近の膜近傍の局所 pH の増加により ROCK の持続的活性化とそれに伴う著しい細胞運動が起こると思われる。



一連の現象は iPSCs から分化した中内胚葉細胞では起こらず、iPSCs 選択的であった。



以上のことから、(1)NHE1 による H<sup>+</sup>の細胞外への汲み出しによって起こる細胞膜近傍の局所 pH の増加が、ROCK の上流のシグナル伝達系および ROCK のキナーゼ活性そのものを活性化すること、(2)その結果として、異常な細胞運動、ストレスファイバー形成・細胞収縮の亢進、細胞膨潤による破裂が生じ、ネクrosisによる細胞死が起こるものと考えられる。この結果は pH の上昇が ROCK の活性化をもたらすという、新たなシグナル伝達系が存在することを示唆する。



また、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換活性を持つモネンシンが分化した細胞にはほとんど影響せず、iPSCs だけを選択的に死滅させることも見出した。これは、ガン化する危険性のある分化後に残る iPSCs を効率的に除去する再生医療における新しい手段となりうる可能性が示している。今回の成果は、J.Biol.Chem. (2019) 294 : 19577-19588 に発表した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masubuchi H, Ueno M, Maeno T, Yamaguchi K, Hara K, Sunaga H, Matsui H, Nagasawa M, Kojima I, Iwata Y, Wakabayashi S, Kurabayashi M.	4. 巻 19
2. 論文標題 Reduced transient receptor potential vanilloid 2 expression in alveolar macrophages causes COPD in mice through impaired phagocytic activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Pulm Med.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12890-019-0821-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura TY, Nakao S, Wakabayashi S	4. 巻 12
2. 論文標題 Emerging Roles of Neuronal Ca <sup>2+</sup> Sensor-1 in Cardiac and Neuronal Tissues: A Mini Review	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front. Mol. Neurosci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnmol.2019.00056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yuko Iwata, Yoshimi Katayama, Yasushi Okuno, Shigeo Wakabayashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Novel inhibitor candidates of TRPV2 prevent damage of dystrophic myocytes and ameliorate against dilated cardiomyopathy in a hamster model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 14042-14067
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.24449	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tomoe Y Nakamura, Shu Nakao, Yukako Nakajo, Jun C Takahashi, Shigeo Wakabayashi, Hiroji Yanamoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Possible signaling pathways mediating neuronal calcium sensor-1-dependent spatial learning and memory in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PloS one	6. 最初と最後の頁 e0170829
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0170829	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Gakuya Takamatsu, Chiaki Katagiri, Tsumuraya Tomoyuki, Chigusa Shimizu-Okabe, Wakako Nakamura, Mariko Nakamura-Higa, Tomoko Hayakawa, Shigeo Wakabayashi, Tsuyoshi Kondo, Chitoshi Takayama, Masayuki Matsushita	4. 巻 482
2. 論文標題 Tescalcin is a potential target of class I histone deacetylase inhibitors in neurons	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1327-1333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) org/10.1016/j.bbrc.2016.12.036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuko Iwata,, S Ito, S Wakabayashi, M Kitakaze	4. 巻 100
2. 論文標題 TRPV2 channel as a possible drug target for the treatment of heart failure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 207-217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) org/10.1038/s41374-019-0349-	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shigeo Wakabayashi, Hirofumi Morihara, Shunichi Yokoe, Takatoshi Nakagawa, Kazumasa Moriwaki, Kiichiro Tomoda, Michio Asahi	4. 巻 294
2. 論文標題 Overexpression of Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger 1 specifically induces cell death in human iPS cells via sustained activation of the Rho kinase ROCK	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 19577-19588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuko Iwata, Shigeo Wakabayashi, Shin Ito, Masafumi Kitakaze	4. 巻 100
2. 論文標題 Production of TRPV2-targeting functional antibody ameliorating dilated cardiomyopathy and muscular dystrophy in animal models	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 324-337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 M. Tsuruoka, K., Wakabayashi, S., Morihara, H., Matsunaga, N., Fujiwara, Y., Goto, I., Imagawa, A., and Asahi	4. 巻 13
2. 論文標題 Exacerbation of autoimmune myocarditis by an immune checkpoint inhibitor is dependent on its time of administration in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijcard.2020.04.033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 若林繁夫、友田紀一郎、横江俊一、森原啓文、朝日通雄
2. 発表標題 ヒトiPS細胞からの心筋分化系を用いた形質膜Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> 交換輸送体の機能解析
3. 学会等名 日本生化学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shigeo Wakabayashi, Kiichiro Tomoda, Shunichi Yokoe, Hirofumi Morihara, Michio Asahi
2. 発表標題 Function analysis of NHE1 using a strategy of cardiomyocyte differentiation from human iPS cells
3. 学会等名 日本生理学会大会 FAOPS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 若林繁夫、友田紀一郎、朝日通雄
2. 発表標題 ヒトiPS細胞からの心筋分化系を用いた遺伝子の機能解析
3. 学会等名 第110回近畿生理学談話会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 若林繁夫、友田紀一郎、金美花、横江俊一、森原啓文、朝日通雄
2. 発表標題 ヒトiPS細胞からの心筋分化系を用いた心筋に高発現するCa2+結合蛋白質CHP3の機能解析
3. 学会等名 Conbio生命科学系合同年会
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----