

令和 2 年 6 月 21 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09580

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来ペースメーカー前駆細胞を用いた生物学的ペースメーカーの開発

研究課題名(英文) Development of progenitors of biological pacemaker from human iPS cells

研究代表者

久留 一郎 (Hisatome, Ichiro)

鳥取大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60211504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：機械式ペースメーカー(PM)の欠点を補うiPS細胞からなる生物学的PMは終末分化しているために、ヒトの心臓を駆動するのに十分な細胞を得られない。そこで増殖可能なPM前駆細胞を樹立することを目的に研究を行った。分化誘導後14日までのHCN4-GFP陽性細胞集団に多分化能を有するPM前駆細胞が存在する。PM前駆細胞の標識であるIsl1もこの細胞群に発現し、HCN4-GFP/Isl1-mCherry二重陽性細胞をPM前駆細胞として選別採取することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は機械式ペースメーカーに代わる生物学的ペースメーカーを十分に供給できる前駆細胞を樹立することを目的として行われ、HCN4-GFP/Isl1-mCherryを前駆細胞として樹立できた。本細胞は増殖能力を示し、かつペースメーカー細胞を含む多分化能を有する前駆細胞である。本細胞により、国産生物学的ペースメーカーを開発でき、海外特許の機械式ペースメーカーに依存しているわが国の医療経済に及ぼすインパクトは計り知れない。

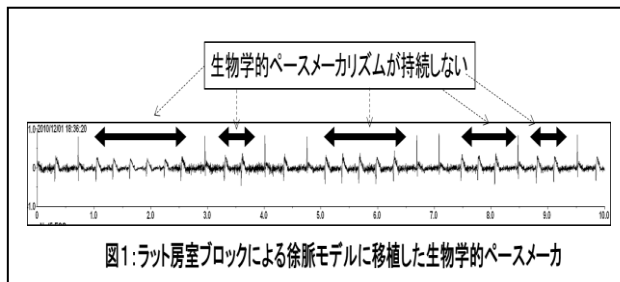
研究成果の概要(英文)：To compensate the disadvantage of artificial pacemaker (PM), we developed the biological PM cell derived from human iPS cells. Because of the limited ability of their proliferation, we attempted to develop the progenitor of human biological PM. The population of HCN4-GFP positive cells within 14days after differentiation involved the progenitor of PM cells, showing the proliferative activity, where mRNA of isl1 has been enriched. Eventually, we developed the HCN4-GFP/Isl1-mCherry double positive cells as the progenitor of PM cells. After characterization of HCN4-GFP/Isl1-mCherry double positive cells, we can provide the human biological PM cells derived from their progenitors.

研究分野：再生医療

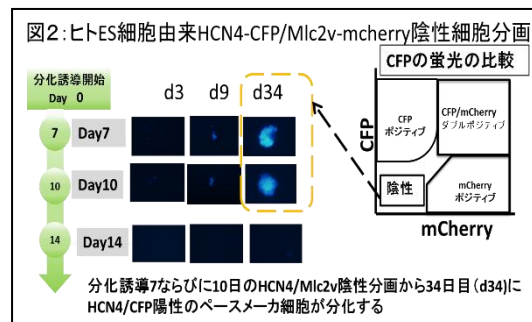
キーワード：iPS cell biological pacemaker progenitor isl1 HCN4

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴って増加する徐脈性不整脈に対しては機械式ペースメーカ移植が標準的治療法であるが、小児の徐脈性不整脈に対しては頻回のバッテリーやペースメーカ本体の交換が必要とされる。近年ペースメーカ感染の増加や自律神経応答の欠如が患者の QOL を低下させるという臨床的な問題が喚起された (Greenspon AJ, et al. J Am Coll Cardiol. 2011;58(10):1001-1006)。これに対して生物学的ペースメーカ



我々の教室の研究者により提唱され (Miake et al, Nature 2002)、その後生物学的ペースメーカ開発の試みが国内外でなされたが実現していない。我々は、洞結節細胞の自動能を担う過分極誘発陽イオン (HCN) 4 チャンネル蛋白をマーカーとしてマウスならびにヒト ES 細胞からペースメーカ細胞 (HCN4-CFP 陽性) を選別採取する独自技術を確立し、ラット房室ブロックモデルでの徐脈に対して本細胞がペースメーカとして作動する (図1) ことを証明して 2015 年に国際特許を取得 (登録番号 5674046 PCT 指定国) した。然るに、ヒト ES 細胞由来 HCN4-CFP 陽性細胞は増殖能を示さないため、移植後宿主心臓の電気緊張的なペースメーカ機能の抑制を凌駕出来る十分な細胞数を得ることができず持続的なペーシングが出来ない (図1)。これを克服するには増殖可能なペースメーカ前駆細胞を樹立し組織を作る必要がある。HCN4 は心筋分化後期ではペースメーカ細胞系譜のマーカーであるが、初期では心室筋細胞系譜 (一次心臓領域: FHF) のマーカーであり、ペースメーカ細胞は 2 次心臓領域 (SHF) から発生する可能性が近年示された。 (Nature Biotechnol 2013)。我々は FHF のマーカーである Mlc2v を mcherry で同時に

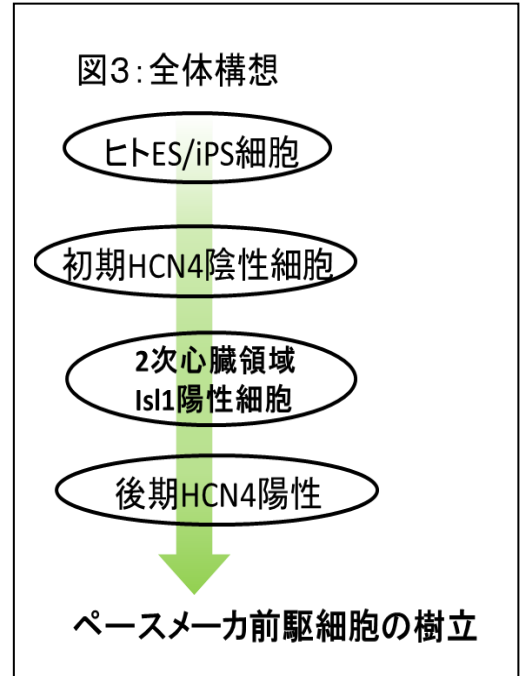


標識できる改変ヒト ES 細胞を用いた予備研究から、分化初期 (day7,10) の HCN4-CFP/Mlc2v-mcherry 両陰性細胞から後期に HCN4-CFP 陽性細胞が出現することを見出した (図2)。これは FHF 以外の領域にペースメーカ細胞に分化する前駆細胞が存在し、分化後期に HCN4-CFP 陽性細胞としてペースメーカ細胞に成熟する可能性がある。我々は SHF からの HCN4 陽性細胞にペースメーカ前駆細胞が含まれると考えており (図2)、HCN4-GFP-BAC ベクター導入ヒト iPS 細胞 (HCN4-GFP hiPS) を樹立した。一方でゲノム編集により、FHF のマーカーである Mlc2v を mcherry で標識できるヒト iPS 細胞 (HCN4-GFP/Mlc2v-mcherry hiPS) の作成を試みている (H27 年度 AMED)。同様の方法で SHF のマーカー isl1 を mcherry で標識したヒト iPS 細胞 (HCN4-GFP/Isl1-mcherry hiPS) を樹立することができれば、分化初期の HCN4 陰性細胞から、分化後期にペースメーカ前駆細胞を HCN4/isl1 二重陽性心筋細胞として選別採取できる。この細胞を用いればペースメーカ細胞の大量調整が可能となり、電気緊張的な自動能抑制を凌駕して心室を駆動するのに十分なペースメーカ細胞数からなる強固な生物学的ペースメーカ組織を作成できるはずである。これらの経緯から、本研究課題「ヒト iPS 細胞由来ペースメーカ前駆細胞を用いた生物学的ペースメーカの開発」を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、マウスならびにヒト ES 細胞で得られた鳥取大学独自の技術とこれまでの知見を基に、ヒト iPS 細胞を心筋細胞へ分化誘導し、SHF の細胞系譜から心筋分化後期に HCN4 陽性細胞を分取することでペースメーカ前駆細胞を樹立できるという仮説（図3）を証明し、ヒト iPS 細胞由来ペースメーカ前駆細胞を用いて生物的ペースメーカ組織を作成する。実際には以下の研究を実施する：

- (1) 既に作成した HCN4-GFP レポーター遺伝子を搭載した BAC ベクターを導入したヒト iPS 細胞を用いてゲノム編集により SHF のマーカーである *Isl1* を mcherry でモニターできるヒト iPS 細胞 (HCN4-GFP/*Isl1*-mcherry hiPS) を樹立する。
- (2) HCN4-GFP/*Isl1*-mcherry hiPS を用いて分化初期の HCN4 陰性細胞から後期に HCN4/*Isl1* 二重陽性細胞 (ペースメーカ前駆細胞) を、HCN4/GFP-*Mlc2v*/mcherry hiPS を用いて HCN4 陽性/*Mlc2v* 陰性細胞 (ペースメーカ細胞) を分化後に選別採取し、両細胞の電気生理学的特性、ならびに増殖能を明らかにする。
- (3) Multi-electrode array (MEA) ならびに Ca indicator を用いて種々の細胞数からなる両細胞の凝集塊の ex vivo でのペースメーカ活性を解析する。両細胞の凝集塊を徐脈モデル動物に移植し、その in vivo でのペースメーカ機能を評価する。



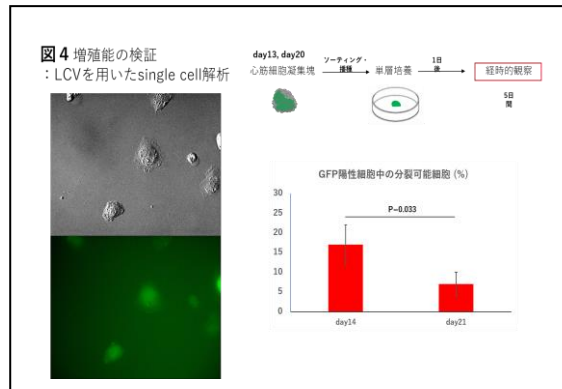
## 3. 研究の方法

- (1) HCN と *Mlc2v* を同時に可視化可能なヒト iPS 細胞の樹立：HCN4-GFP/BAC hiPS (HCN4-GFP レポーター遺伝子搭載 BAC ベクターを遺伝子導入したヒト iPS 細胞) を用いて、心室筋のマーカーである *Mlc2v* の相同配列を有するターゲティングベクターを構築した。CRISPR/Cas9 システムを利用したゲノム編集によって *Mlc2v* の発現を mCherry 蛍光によって選択的に分取するための iPS 細胞 (HCN4-GFP/*Mlc2v*-mcherry hiPS) を樹立した。ヒト iPS 細胞の心筋分化誘導法を用いて心筋へ分化誘導を行った。蛍光顕微鏡を用いて、拍動部位の HCN4-GFP 蛍光と *Mlc2v*-mcherry 蛍光が強いクローンを複数樹立した。
- (2) *Isl1* と HCN4 を同時に可視化可能なヒト iPS 細胞の樹立：HCN4-GFP/BAC hiPS (HCN4-GFP レポーター遺伝子搭載 BAC ベクターを遺伝子導入したヒト iPS 細胞) を用いて、SHF のマーカーである *Isl1* の相同配列を有するターゲティングベクターを構築した。CRISPR/Cas9 システムを利用したゲノム編集によって *Isl1* の発現を mCherry 蛍光によって選択的に分取するための iPS 細胞 (HCN4-GFP/*Isl1*-mcherry hiPS) を樹立する。ヒト iPS 細胞の心筋分化誘導法を用いて心筋へ分化誘導を行った。蛍光顕微鏡を用いて、拍動部位の HCN4-GFP 蛍光と *Isl1*-mcherry 蛍光が強いクローンを複数樹立した。
- (3) 生物学的解析：GFP 並びに mCherry 陽性細胞をフローサイトメータで解析し、FACS

にて回収した。遺伝子発現を real time RT-PCR で、蛋白発現を免疫染色法で、経時的な細胞増殖をインキュベータ顕微鏡（LVC）で観察した。

#### 4. 研究成果

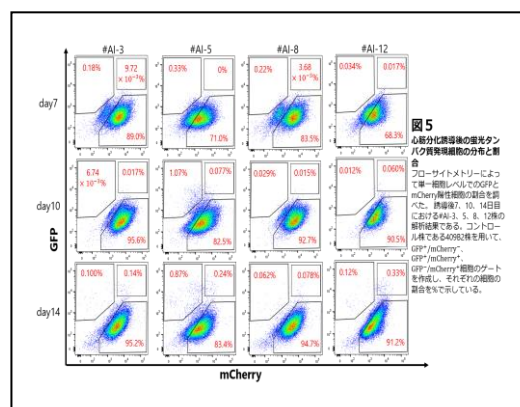
1) HCN4-GFP 陽性細胞の経時的分取と分子生物学的特性の評価: HCN4-GFP 搭載ヒト iPS 細胞を分化誘導し、経時的に HCN4-GFP 細胞を採取し、その増殖能と測定した誘導初期に採取した HCN4 陽性細胞は Tbx5 を発現した FHF 様の遺伝子発現が濃縮されていた。一方で HCN4-GFP 陰性細胞には Is11 及び KDR を発現する SHF の細胞が濃縮されていた。Ki-67 で染色することで細胞分裂細胞数を検討する



と iPS 細胞由来心筋組織中の HCN4 陽性細胞は増殖能を示し、幹細胞としての性質を有する細胞群が存在するのかを検討した。HCN4GFP 陽性細胞は誘導後 14 日目 Ki-67 陽性の増殖能を示したが、28 日目では増殖性細胞数が低下していた。LCV を用い セルソーターによって分画した HCN4-GFP 陽性細胞の single cell レベルでの経時的観察を行うと、誘導後 14 日目の GFP 陽性細胞は single cell から複数回分裂を繰り返しながら増殖していた (図 4)。その分化能を検討したところ、本細胞は誘導後 14 日目に採取した細胞が心房筋、心室筋、刺激伝導系、血管平滑筋など種々の細胞へと分化できる能力を持つことが示唆された。以上から、分化誘導初期の HCN4-GFP 陽性細胞には FHF 由来の心臓前駆細胞であり、増殖能と多分化能を示すことが判明した。

2) HCN4 と Is11 を可視化できるヒト iPS 細胞株 (HCN4-GFP/Is11-mcherry hiPS 細胞) の樹立: ヒト iPS 細胞の Is11 遺伝子座にゲノム編集を用いて mcherry 遺伝子の導入を試みた

が、クローンを得ることが出来なかった。そこで、BAC ベクター上で Is11 遺伝子座に mcherry を相同遺伝子組み換えにより導入することを試み、クローンを得ることが出来た (図 5)。本研究の目的遺伝子である Shox2 の分化誘導における発現を、段階的に解析を行った。分化誘導を開始して、day4、7、14、21、28 に回収した細胞から RNA を抽出し、cDNA を合成し、PCR によって Shox2、HCN4、 $\beta$ -actin の遺伝子発



現を解析した。FA2 株における解析において、Shox2 の発現は未分化の状態のときから観察され、誘導開始 14 日目以降に発現が上昇していることが確認された。また、HCN4 の発現も未分化の状態から観察され、誘導開始後 7 日目に一度発現が低下し、それ以降では発現が上昇していることが確認された。B13 株では、Shox2 の発現は未分化の状態か

ら観察され、誘導開始 21 日目以降に発現 が上昇していることが確認された。また、HCN4 の発現も未分化の状態から観察され、誘 導開始後 7 日目に一度発現が低下し、それ以降では発現が上昇していることが確認された。

3) HCN4-GFP 陽性/Mlc2v-mcherry 陰性細胞並びに二重陽性細胞の分取と電気生理学ならびに分子生物学的特性の評価: 分化誘導後に HCN4-GFP 単独陽性細胞を複数のクローンから採取し、その電気生理学的特性の解析を行った。HCN4-単独陽性細胞は 90%が洞結節型自動能を、10%が心室型自動能を有していた。HCN4-GFP/Mlc2v-mcherry 二重陽性細胞は HCN4-GFP 単独陽性細胞や iCell CMs と異なり Na channel の活性が著しく大きく、かつ活動電位持続時間が長くプルキンジェ線維細胞様特性と考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Sayaka Yonemizu, Keiichiro Masuda, Yasutaka Kurata, Tomomi Notsu, Yuhei Higashi, Kenta Fukumura, Peili Li, Haruaki Ninomiya, Junichiro Miake, Motokazu Tsuneto, Yasuaki Shirayoshi, Ichiro Hisatome	4. 巻 10
2. 論文標題 Inhibitory effects of class I antiarrhythmic agents on Na <sup>+</sup> and Ca <sup>2+</sup> currents of human iPS cell-derived cardiomyocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regen Ther.	6. 最初と最後の頁 104-111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2018.12.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kenshiro Yamamoto, Yasutaka Kurata, Yumiko Inoue, Maya Adachi, Motokazu Tsuneto, Junichiro Miake, Kazuhide Ogino, Haruaki Ninomiya, Akio Yoshida, Yasuaki Shirayoshi, Yoshiko Suyama, Shunjiro Yagi, Motonobu Nishimura, Kazuhiro Yamamoto, and Ichiro Hisatome	4. 巻 9
2. 論文標題 Pretreatment with an angiotensin II receptor blocker abolished ameliorating actions of adipose-derived stem cell sheets on cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Regen Ther.	6. 最初と最後の頁 79-88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2018.08.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamauchi K, Li J, Morikawa K, Liu L, Shirayoshi Y, Nakatsuji N, Elliott DA, Hisatome I, Suemori H.	4. 巻 495(1)
2. 論文標題 Isolation and characterization of ventricular-like cells derived from NKX2-5eGFP/w and MLC2vmCherry/w double knock-in human pluripotent stem cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 1278-1284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.11.133.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Miake J, Notsu T, Higaki K, Hidaka K, Morisaki T, Yamamoto K, Hisatome I.	4. 巻 12(8)
2. 論文標題 Cited4 is related to cardiogenic induction and maintenance of proliferation capacity of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes during in vitro cardiogenesis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0183225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0183225.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kurata Yasutaka, Tsumoto Kunichika, Hayashi Kenshi, Hisatome Ichiro, Kuda Yuhichi, Tanida Mamoru	4. 巻 10
2. 論文標題 Multiple Dynamical Mechanisms of Phase-2 Early Afterdepolarizations in a Human Ventricular Myocyte Model: Involvement of Spontaneous SR Ca <sup>2+</sup> Release	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 1545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.3389/fphys.2019.01545.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Adachi M, Watanabe M, Kurata Y, Inoue Y, Notsu T, Yamamoto K, Horie H, Tanno S, Morita M, Miake J, Hamada T, Kuwabara M, Nakasone N, Ninomiya H, Tsuneto M, Shirayoshi Y, Yoshida A, Nishimura M, Yamamoto K, Hisatome I.	4. 巻 25
2. 論文標題 -Adrenergic Blocker, Carvedilol, Abolishes Ameliorating Actions of Adipose-Derived Stem Cell Sheets on Cardiac Dysfunction and Remodeling After Myocardial Infarction.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circ J.	6. 最初と最後の頁 2282-2291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1253/circj.CJ-19-0261.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 増田啓一郎、米水彩香、東祐平、福村健太、三明淳一郎、小倉一能、白吉安昭、山本一博、久留一郎
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来心筋 (iCell CMs) の電気生理学的特性とClass 1群抗不整脈薬によるNa <sup>+</sup> ならびにCa <sup>2+</sup> channel阻害効果
3. 学会等名 第65回日本不整脈心電学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 東祐平、福村健太、増田啓一郎、米水彩香、宮城香乃望、足立隆、久留一郎、経遠智一、白吉安昭
2. 発表標題 心臓発生メカニズムの解明を目的とする新規hiPS細胞株の樹立と解析
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 東祐平、福村健太、増田啓一郎、米水彩香、久留一郎、白吉安昭
2. 発表標題 ヒトiPS細胞に由来する心筋前駆細胞の選別採取とその解析
3. 学会等名 第40回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 米水彩香、増田啓一郎、東祐平、福村健太、三明淳一郎、小倉一能、白吉安昭、山本一博、久留一郎
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来心筋 (iCell CMs) の電気生理学的特性とClass 1群抗不整脈薬によるNa <sup>+</sup> ならびにCa <sup>2+</sup> channel阻害効果
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miake J, Notsu T, Yamamoto K, Hisatome I.
2. 発表標題 Cited4 is related to cardiogenic induction and maintenance of proliferation capacity of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes during in vitro cardiogenesis.
3. 学会等名 第108回日本循環器学会集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 新規刺激伝導系細胞様細胞	発明者 白吉安昭、森川久未、久留一郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-062705	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-



