

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：82626

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22514

研究課題名(和文) 生体材料とiPS細胞を用いた洞結節組織構築によるヒト心臓拍動制御機構の解明

研究課題名(英文) Construction of three-dimensional human sinus node tissue derived from iPSCs by using biomaterials

研究代表者

森川 久未 (Kumi, Morikawa)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：90707217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：心臓の規則正しい拍動は、洞結節に存在するペースメーカー細胞が制御しています。ペースメーカー細胞が発する電気刺激(自動能)が一方方向性の下流の心房、心室に伝わることにより、ヒト心臓の協調した収縮が生まれ出されます。しかしながら、ヒト心臓からペースメーカー細胞を直接採取することは困難であるため、ヒトペースメーカー細胞の解析はほとんど進んでいませんでした。そこで本研究では、ヒトiPS細胞からペースメーカー細胞を高純度に分取できる実験系を利用し、ペースメーカー細胞の高効率的分取法について検討しました。さらに、生体材料を用いたヒトiPS細胞由来心筋細胞の三次元組織化について開発を行っています。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によってヒトiPS細胞由来ペースメーカー細胞の高純度に分取が可能となりました。また、心筋細胞の三次元組織化にも取り組んでいます。本研究から得られたヒトペースメーカー細胞の知見は、不整脈疾患の疾患原因の解明や治療法の開発につながることで期待できます。さらにこの将来展望としては、分取したペースメーカー細胞を生物学的ペースメーカー細胞として、不整脈疾患、特に徐脈性不整脈の再生医療の移植用の細胞源として使用することが可能となります。加えて、分取したペースメーカー細胞は創薬開発時の試験細胞として毒性評価や抗不整脈薬のスクリーニングに利用するなどの創薬への応用ができます。

研究成果の概要(英文)：The regular heart beats are produced by pacemaker cells located in sinus node. The electric impulse (pacemaker action potential) produced by pacemaker cells transmit into downstream atrium and ventricles and creates coordinated contraction of the human heart. However, it is impossible to isolate living pacemaker cells from human heart tissue. Therefore, there are little progress has been reported about human pacemaker cells. In this study, we focused on human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) and developed the novel method for isolating human pacemaker cells from iPSCs cardiac differentiation with high purity by using fluorescent proteins. Furthermore, we are developing a new method for three-dimensional organization of hiPSCs-derived cardiomyocytes by using biomaterials.

研究分野：幹細胞生物学, 生理学, 循環器内科学, 発生学

キーワード：iPS細胞 心臓 ペースメーカー細胞 幹細胞 生体材料 再生医学

## 1. 研究開始当初の背景

心臓の規則正しい拍動は、洞結節に存在するペースメーカー細胞が発する電気刺激（自発性活動電位＝自動能）が源となる。この電気刺激が、複雑な構造を持つ心臓内で、洞結節から心房、心室へと一方向性に秩序正しく伝わり、心拍を生み出す。洞結節の組織構造は、心房筋との境界部（辺縁部に相当）から中心部につれてギャップ結合の数が減少する (Anumonwo JM, et al. *Circ Res.* 1992)。このため、周囲の心房筋からの電気緊張電位の影響を受けにくく、ペースメーカー機能を維持できると考えられている。しかしながら、ヒト心臓の構造において、自動能の伝導性やギャップ結合の分布に、どのような構造が関与しているのかはわかっていない。

ペースメーカー細胞の機能不全は徐脈性不整脈と呼ばれる心拍数が遅くなる不整脈に直結する。徐脈性不整脈は加齢に伴い増加し、70歳代では10%弱が発症するため、高齢化が進む日本においては深刻な疾患である。この原因には、加齢に伴い、ペースメーカー細胞が減少したり、機能低下することや、ペースメーカー細胞数の減少に伴い、洞結節組織の結合組織の線維化が進行することなどと考えられているが、正確な不整脈の原因、発症メカニズムやその分子機序、洞結節の構造と機能との関連などは解明されていない。これは、ヒトにおいて、洞結節組織を生体から直接採取することが不可能なためである。

この問題を解決するために、我々はヒト ES/iPS (Embryonic Stem; ES / induced Pluripotent Stem; iPS) 細胞に着目してきた。ヒト ES/iPS 細胞の心筋分化誘導法では、ペースメーカー細胞・心房筋・心室筋、心筋以外の線維芽細胞などがランダムに入り混じって分化誘導されてくる。そこで、我々は各細胞のマーカー遺伝子の発現を蛍光タンパク質で可視化したヒト ES/iPS 細胞を樹立し、心筋細胞分化誘導系からペースメーカー細胞と心房・心室筋細胞を分取する技術を開発してきた (Morikawa K, et al. *PACE.* 2010, 他多数)。

本研究では、この技術を利用し、ヒトペースメーカー細胞を分取、解析することで、ヒト心臓の拍動制御機構の解明を目指す。さらに心筋細胞の各種分取技術を活用して、生体材料と組み合わせることで洞結節組織の三次元組織化を試みることで、ヒト心臓の組織構造と自動能の伝導性、さらにその破綻メカニズムや疾患との関連性について明らかにすることを立案した。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々が独自に開発したヒト ES/iPS 細胞の選別分取法を基に、(1) ヒトペースメーカー細胞をより高純度で選別分取する手法を開発する。さらに、(2) 分取したペースメーカー細胞と生体材料を用いて、心筋組織、特に洞結節様組織の三次元組織化を試みる。これらの研究により、洞結節組織構造の特徴と自動能の伝導メカニズムとの関連を明らかにする。

また、ペースメーカー細胞の破綻は、徐脈性不整脈などの心疾患の発症に繋がる。そこで、遺伝子改変ヒト iPS 細胞株を樹立し、(3) ヒト iPS 細胞を利用した徐脈性不整脈モデルを構築することによって、不整脈などの発症、病態解析モデルを開発する。

以上の研究を通して、ヒト心臓の拍動制御機構とその破綻メカニズムを解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) ヒトペースメーカー細胞の分取：ペースメーカー機能（自動能）を生み出す HCN (Hyperpolarization-activated nucleotide gated K<sup>+</sup>) イオンチャネルをコードする HCN4 と、ペースメーカー細胞の発生・分化に関連する転写因子 Shox2 (Short Stature Homeobox2) の二つの遺伝子の発現を指標として、ヒト iPS 細胞に由来する洞結節ペースメーカー細胞を選択的に分取することとした。具体的には、HCN4 の発現を緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescence Protein: GFP) で、同時に Shox2 の発現を赤色蛍光タンパク質 (mCherry) で可視化できる二重遺伝子組換え iPS 細胞株を樹立する。このヒト iPS 細胞株を既報の分化誘導法 (Yamauchi K, et al. *Genes to Cells.* 2010) によって、心筋細胞へ分化誘導した。分化誘導後の心筋細胞の蛍光発現について、蛍光顕微鏡で観察するとともに、心筋分化誘導後 60 日目前後の細胞を、蛍光活性化細胞選別装置 (FACS) を用いて緑色蛍光と赤色蛍光を指標に分取し、各種解析をおこなった。

また、HCN4 陽性細胞の出現率を指標に、ペースメーカー細胞の分化誘導法の改良を試みた。具体的には、分化誘導時の細胞の播種条件、Wnt シグナル活性化のタイミング等を検討した。

(2) 心筋細胞の三次元組織化: アガロースカプセルの手法 (Agudelo C, et al. *Transplantation.* 2009) を応用し、アガロースカプセル内に分取したペースメーカー細胞からなる凝集塊の作製を試みた。

(3) 徐脈性不整脈モデルの構築：自動能生成に関わる HCN4 の障害は、徐脈性不整脈などの洞不全症候群の発症へとつながる。そこで、ペースメーカー細胞における自動能の生成に関与する HCN4 遺伝子をコンディショナルにノックアウトできるヒト iPS 細胞株を樹立することによって、徐脈性不整脈モデルの構築を試みた。具体的には、Cre DNA 組換え酵素によって、HCN4 遺伝子を loxP 組換えによってノックアウトできる flox-HCN4 改変ヒト iPS 細胞株を作製した。

#### 4. 研究成果

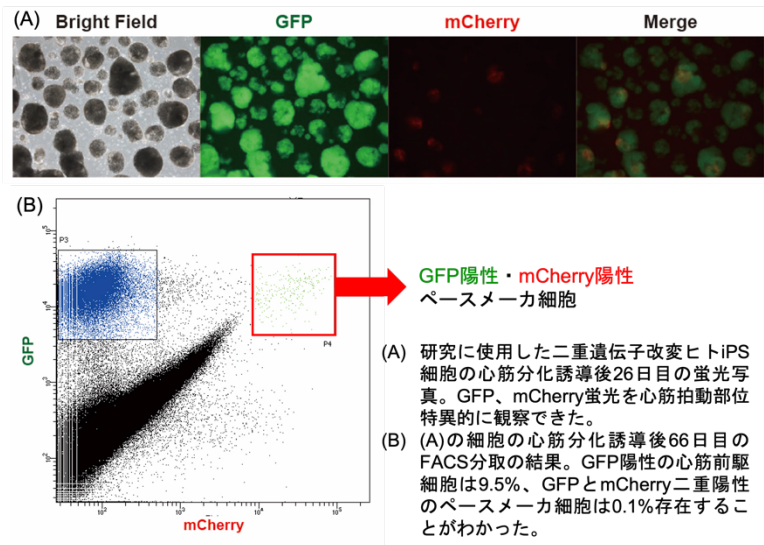
##### (1) ヒトペースメーカー細胞の分取・高純度化

本研究費の支援を受けて、初年度はヒト iPS 細胞の培養と心筋分化誘導の実験系、分子生物学など本研究に必要な全ての実験系をゼロから立ち上げた。

まず、心筋分化誘導実験系の立ち上げの過程で、心筋の分化誘導効率が極めて低かったため、心筋細胞への分化誘導効率を向上するための検証をおこなった。①細胞の播種条件、② GSK-3 阻害剤の添加濃度、③浮遊培養への移行日などを中心に、各種培養条件の比較検証を行った。その結果、Yamauchi らのオリジナルプロトコルを改良し、より低密度で分化誘導するか、培地を増量することが有効であること、誘導後4~5日目にかけて、Wnt シグナルの活性化剤 CHIR99021 の代わりに、阻害剤 IWP2 を添加することによって、HCN4 陽性細胞の分化誘導効率を2倍程度向上させることに成功している。

また、HCN4 陽性細胞を分取し、電気生理学的特性を調べたところ、およそ20%の細胞しか典型的なペースメーカー細胞様の活動電位を示さなかった。そこで、より高純度にペースメーカー細胞を分取するために、これまでの HCN4 イオンチャネルに加えて、ペースメーカー細胞の発生に重要である転写因子 Shox2 (Espinoza-Lewis R, et al. *Dev Biol.* 2009) との二重陽性細胞をペースメーカー細胞として分取することにした。方法に記載した通り、HCN4 遺伝子を GFP 蛍光で、Shox2 遺伝子を mCherry 蛍光で可視化できる二重遺伝子改変ヒト iPS 細胞を CRISPR/Cas9 によるゲノム編集法により作製した。改良した分化誘導法で心筋細胞へ分化誘導すると、全体の約0.1-0.3%が二重陽性細胞として分取できることが明らかとなった (図1)。予備的な検証結果ではあるが、二重陽性細胞の70%以上は、ペースメーカー細胞様の活動電位を示すことが分かり、高純度化に成功した (論文 revise 中)。

図1: ヒトiPS細胞由来ペースメーカー細胞の分取



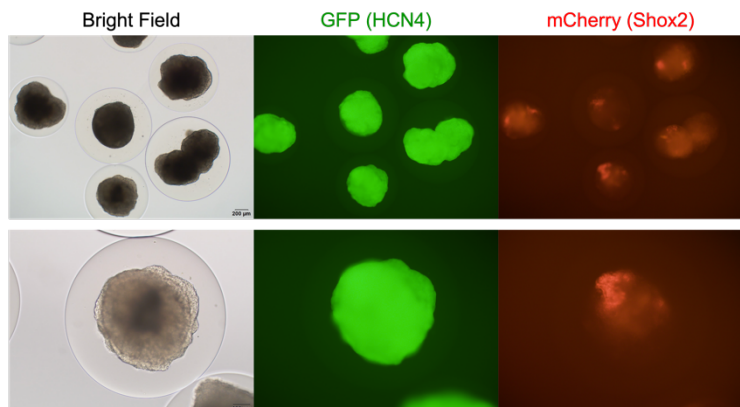
##### (2) 分取後のペースメーカー細胞の長期培養方法の検証

心筋細胞の三次元組織化の初期検討として、分取したペースメーカー細胞の表現型を維持したまま長期培養可能な培養条件の開発をおこなった。この結果、分取後、浮遊培養で細胞凝集塊を作製し、浮遊培養条件で培養する手法において、分取後90日以上、蛍光を維持したまま培養可能であることが判明した。

図2: アガロースカプセルにより三次元化した心筋細胞

##### (3) 心筋細胞の三次元組織化

心筋細胞の三次元組織化と長期安定培養法の開発として、アガロースカプセルを用いた培養方法を検証した。結果、浮遊培養によって作製した細胞凝集塊をカプセル化することで、さらに安定的に三次元組織化をおこなえることがわかってきている (図2)。今後は分取したペースメーカー細胞をカプセル化し、長期培養することで、機能性を安定的に維持できるかどうか評価する予定である。



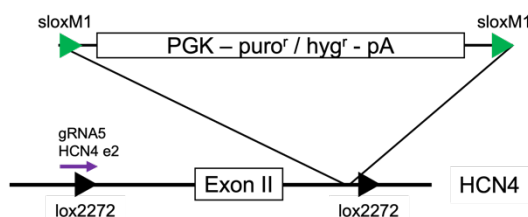
二重遺伝子改変ヒトiPS細胞を心筋分化誘導し、アガロースカプセルにより三次元組織化した蛍光写真。心筋細胞がカプセルに内包されている様子が観察できる。下図は高倍率写真。

##### (4) ヒト iPS 細胞における HCN4 ノックアウトの開発

ヒト心臓の拍動制御機構とその破綻メカニズム、徐脈性不整脈の原因について検証するために、HCN4 遺伝子をコンディショナルにノックアウトできるヒト iPS 細胞の樹立を進めている。

具体的には、内在の HCN4 遺伝子をノックアウトするために、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用い、HCN4 遺伝子の第 2 エクソン前後のイントロン内に loxP 配列を挿入するための遺伝子組換え用ベクターを構築した。別々の薬剤選択遺伝子を用いた 2 種類のベクターを計画した (図 3)。これにより、内在の HCN4 遺伝子の両アレルを改変し、loxP 組換えにより HCN4 遺伝子を完全にノックアウトできるようにしている。現在、作製したベクター (puromycin 型) をヒト iPS 細胞へ遺伝子導入し、細胞株の樹立と同時にノックイン株のスクリーニングを PCR によりおこなった。結果、4/24 株で loxP 配列の HCN4 遺伝子座へのノックインを確認できた。現在、残りの 2 つ目のアレルへのノックインを進めている最中である。

図3: コンディショナルノックアウトベクターの模式図



HCN4のエクソンIIをはさむように、loxP2272配列を前後のイントロン内に配置した。また、薬剤選択のためにhygromycinあるいはPuromycin 耐性遺伝子を、sCreで除去可能なsloxM1配列で囲んで配置した。

HCN4のエクソンIIをはさむように、loxP2272配列を前後のイントロン内に配置した。また、薬剤選択のためにhygromycinあるいはPuromycin 耐性遺伝子を、sCreで除去可能なsloxM1配列で囲んで配置した。

以上の研究成果は、ヒト心臓の拍動制御機構の解明や、不整脈疾患の原因解明、治療法の開発につながることを期待される。さらに、将来的には分取したペースメーカー細胞を再生医療に利用することや、ペースメーカー細胞を用いた創薬の毒性評価試験法の開発、創薬スクリーニング系の開発へ、研究を展開していく計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森川久未、白吉安昭、久留一郎、廣瀬志弘
2. 発表標題 生体材料による生物学的ペースメーカーの三次元組織構築
3. 学会等名 第19回産総研・産技連LS-BT合同研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森川久未、白吉安昭
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来心臓ペースメーカー細胞による創薬毒性試験法開発の試み
3. 学会等名 第20回産総研・産技連LS-BT合同研究発表会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>researchmap 森川久未  <a href="https://researchmap.jp/kumi-morikawa">https://researchmap.jp/kumi-morikawa</a></p> <p>産総研 健康医工学研究部門 生体材料研究グループ  <a href="https://unit.aist.go.jp/hmri/group/bm/index.html">https://unit.aist.go.jp/hmri/group/bm/index.html</a></p>
---

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
研究協力者	白吉 安昭  (Shirayoshi Yasuaki)  (90249946)	鳥取大学・医学部・准教授    (15101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	寺村 裕治  (Teramura Yuuji)  (10365421)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・上級主任研究員    (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関