

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19359

研究課題名(和文)ダイレクトリプログラミングによる心臓ペースメーカー細胞誘導法の確立

研究課題名(英文)Establishment of cardiac pacemaker cells via direct reprogramming methods.

研究代表者

川村 晃久(Kawamura, Teruhisa)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：90393199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：心拍数が著しく低下する重症徐脈性不整脈では機械式ペースメーカーによる治療が普及しているが、感染、自律神経不応答、高額医療などが問題となる。そこで、本研究では、機械に代わる心臓ペースメーカー細胞を別の細胞から誘導する方法の確立を目指した。はじめに、ペースメーカー組織で蛍光を発するレポーターマウスの発生期心臓を用いたRNA-seqからGFP陽性細胞で高発現する遺伝子群を抽出した。次に、発生期のマウス心臓の各領域からATAC-seqを行い、上記の遺伝子群で心房特異的オープンクロマチン領域をもつものを候補因子とした。これらの因子については、線維芽細胞に遺伝子導入してペースメーカー細胞への誘導効率を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子導入によるダイレクトリプログラミング法は、体細胞から機能成熟した細胞が得られると期待される。多能性幹細胞を用いた分化培養と比べて未分化細胞の除去や分化細胞の成熟化が省略され、時間と費用を節約できるため、臨床応用へ向けた基礎研究として意義深い。研究成果は、本邦で6万件以上の移植術が行われる機械式ペースメーカーの欠点を克服した新たなツールとして、生産者年齢から高齢まで幅広い患者の予後改善や生活の質の向上に大きく貢献すると期待される。さらに、本研究は未解明な心臓ペースメーカー組織の発生制御分子ネットワークの解明にも繋がり、学問的な芽生えとなる研究成果といえる。

研究成果の概要(英文)：Loss or dysfunction of cardiac pacemaker cells in sinus nodes leads to a severe bradyarrhythmia which requires mechanical pacemaker implantation. However, the strategy using the mechanical device harbors the problems such as infection, autonomic unresponsiveness, and expenditure. Thus, we attempted to create cardiac pacemaker cells converted from other cell types. First, fetal hearts were removed from the reporter mice expressing green fluorescence under the control of pacemaker cell-specific gene, Hcn4. RNA-seq was then performed to select the highly expressed genes in HCN4-positive cells. Second, fetal hearts were separated into four regions (atria, atrioventricular canals, ventricles, and outflow tracts) and were subjected to ATAC-seq to examine the open chromatin regions in the genome. Genes highly expressed in cardiac pacemaker cells with atrium-specific open chromatin region were selected as candidates and tested for direct reprogramming toward cardiac pacemaker cells.

研究分野：再生医学

キーワード：ダイレクトリプログラミング 心臓ペースメーカー細胞 再生医学

1. 研究開始当初の背景

先進国で主要な死因を占める心不全は致死性不整脈を合併する。また、過労死や突然死の原因の多くを致死性不整脈が占めており、超高齢社会を迎える本邦において生産者層の突然死・過労死を予防することは、医療だけでなく経済活性化の問題においても重点課題といえる。致死性不整脈の中でも心拍数が著しく低下する重症徐脈性不整脈では機械式ペースメーカの移植が主な治療法として普及している。しかし、感染、自律神経不応答、高額医療（～250万円）などの課題を抱えるため、ペースメーカ組織を再生させる新たな治療法の開発が急務となっている。心臓の拍動は右心房に限局する微小な心臓ペースメーカ組織・洞房結節が制御しているが、強度の持続運動や心不全が引き金となりストレスが加わるとその機能が障害される。

現在、徐脈に対する新たな治療法の開発を目指して、心拍数を制御する心臓ペースメーカ細胞を培養皿上で作製し、これを「生物学的ペースメーカ (biological pacemaker)」という新たな機能再生ツールとして確立する研究が進められている。洞房結節はヒトでも長さ1cm、幅0.5cm程度の小型組織であり、その機能再生には多量の細胞は必要でないが、効率的な作製法は未だ確立されていない。心臓発生期に必須とされる3つの転写因子 GATA4, MEF2c, TBX5 により「心室筋細胞」への細胞転換 (ダイレクトリプログラミング) が可能となったが、「心臓ペースメーカ細胞」への転換については報告が少なく誘導効率も低く、機能的な解析も十分と言えない状況ではない。

2. 研究の目的

本研究では、機械に代わる心臓ペースメーカ細胞を別の細胞から誘導する方法の確立を目指し研究を行った。はじめに、ペースメーカ組織の発生制御分子ネットワークに着目し心臓ペースメーカ組織発生における制御因子の同定を試みた。次に、得られた制御因子に関する情報をもとに、体細胞から心臓ペースメーカ細胞への転換に有用か否かを検証し、体細胞由来の生物学的ペースメーカ作製技術の基盤構築を目指した。

3. 研究の方法

心室筋細胞への転換 (ダイレクトリプログラミング) と比較し、「心臓ペースメーカ細胞」への転換については報告が少なく誘導効率も低く、機能的な解析も十分と言えない状況ではない。そこで、本研究では未解明な点が多い心臓ペースメーカ組織の発生に重要な制御因子を同定するために、胎生期から成体に至る心臓内でペースメーカ細胞特異的遺伝子 HCN4 の発現制御下で緑色蛍光を発するレポーターマウスを用いて実験を行った。マウス発生の各段階の心臓から GFP 陽性細胞と陰性細胞をセルソーターにより分離し網羅的遺伝子発現解析 (RNA-seq) を独自に実施し解析を行った。さらに、発生段階の心臓の各領域から ATAC-seq を施行し、心房内 HCN4 陽性細胞で発現する遺伝子について転写活性化領域の指標であるオープンクロマチン領域の同定を試みた (図1)。

上記の実験で得られた情報をもとに、体細胞から心臓ペースメーカ細胞への転換に有用な候補因子を選出した。Hcn4-GFP マウス由来の線維芽細胞に候補因子を遺伝子導入した後、ペースメーカ細胞への転換について評価した。評価方法としては、心臓ペースメーカ細胞の形質獲得に伴って発現する GFP を指標にフローサイトメトリーを用いた効率的なスクリーニングを採用した。また、細胞成熟度についてはペースメーカ特異的分子 (HCN4, Cx45 など) の発現を蛍光免疫染色や定量PCRで評価し、自発性の電気活動については多電極アレイや細胞内カルシウム濃度の変化を蛍光イメージングにより解析した。

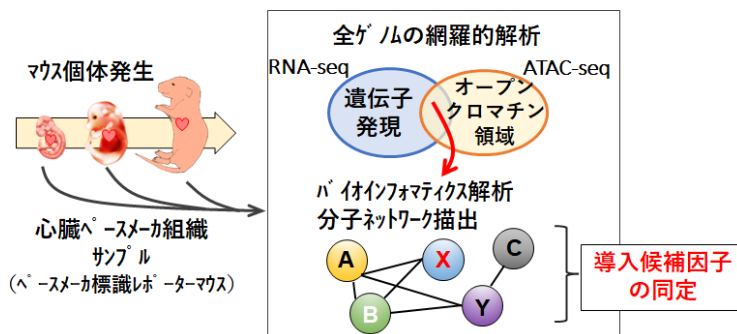


図1. 本研究の方法の概略

4. 研究成果

(1) マウス心臓発生期における HCN4 陽性細胞で高発現する遺伝子群の解析

マウスの心臓発生は胎生 7.5～12.5 日 (E7.5～E12.5) に生じ、洞房結節は、右心房の一部と同様に二次心臓領域が起源とされている。洞房結節が心房内で形成されていく E8.5 から E12.5 にかけてダイナミックに発現変動する洞房結節特異的な遺伝子群が、洞房結節細胞を特徴づける重要な制御因子と考えられる。ゆえに、こうした制御因子の中に細胞の性質を転換しうるリプログラミング遺伝子が含まれている可能性が高い。

そこで、胎生期から成体期まで洞房結節特異的に発現する HCN4 遺伝子の発現制御下に緑色蛍光タンパク質が発現するレポーターマウスを用いて、E8.5、E10.5 および E14.5 の胎仔の心臓から GFP 陽性細胞と陰性細胞をセルソーターにより選別して RNA-seq を実施した。その結果、GFP 陽性、陰性細胞でそれぞれ高発現する遺伝子群を主成分解析したところ、胎生 8.5 日から心発生ステージが進むにつれて、それぞれの特徴が際立っていく結果を得た (図 2)。このことは、心臓発生過程で洞房結節を形成する HCN4 陽性細胞が、心房や心室の主たる構成細胞である作業心筋とは異なる特殊な細胞であることを示唆する結果といえる。

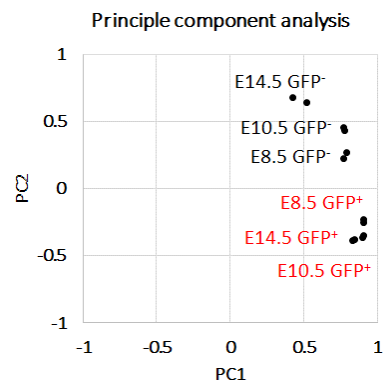


図 2. マウス心臓発生過程における HCN4-GFP 陽性・陰性細胞で高発現する遺伝子群の主成分解析

(2) HCN4 陽性細胞で高発現する遺伝子における発生期心臓内各領域での発現パターン

胎生期の HCN4 陽性細胞の中には、一次心臓領域由来で肉柱側の心室筋に一過性に発現する報告もなされている。この知見から、HCN4 陽性細胞で高発現する遺伝子群は、心房内洞房結節予定領域以外の心臓領域にも発現している可能性が考えられる。そこで、ルーピング期のマウス心臓を、心房・房室管・心室・流出路の 4 領域に分けて採取し RNA-seq による網羅的遺伝子解析を行った。その結果、HCN4 陽性細胞で高発現する遺伝子群の多くが、心房で高発現している遺伝子群とオーバーラップしていることが見いだされた (図 3)。また、興味深いことに心室以外にも、房室管や流出路に高発現する遺伝子群とも一部オーバーラップしていた。

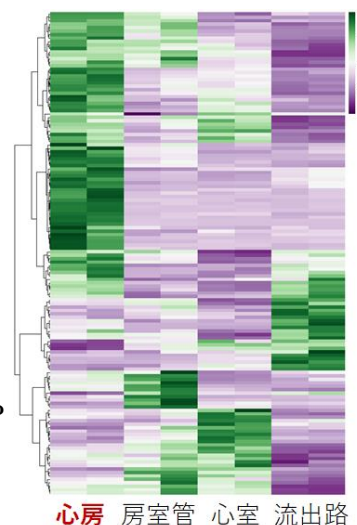


図 3. 胎生期マウス心臓 HCN4-GFP 陽性細胞で高発現する遺伝子群の、心臓内 4 領域 (心房・房室管・心室・流出路) における発現分布

(3) 心房内 HCN4 陽性細胞で高発現する遺伝子群に対するオープンクロマチン領域の解析

心房かつ HCN4 陽性細胞で高発現する遺伝子群に対して、上流の転写制御機構を解明する目的で、オープンクロマチン領域を心臓内の各領域と比較して解析した。ルーピング期のマウス心臓を、心房・房室管・心室・流出路の 4 領域に分けて採取し、ATAC-seq を施行したところ、心房で特異的にピークをもつオープンクロマチン領域が同定された。それらの多くが転写開始点近傍のプロモーター領域より遠位のエンハンサー領域に存在することも見出された (図 4)。

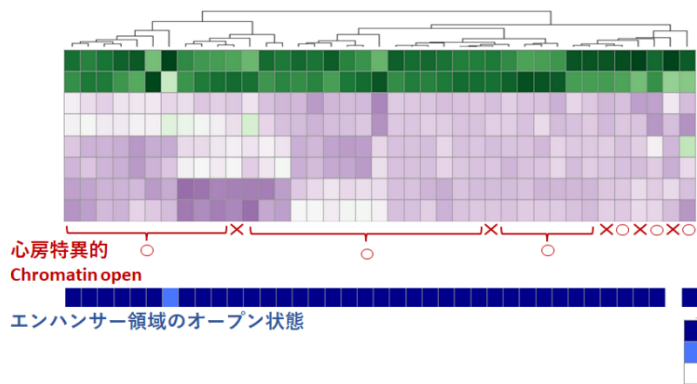


図 4. 胎生期マウス心臓内の HCN4-GFP 陽性細胞で高発現する遺伝子群に対するオープンクロマチン領域の網羅的解析

(4) まとめ

以上より、HCN4 陽性細胞と右心房で高発現する遺伝子群は、右心房内で洞房結節へと分化していく特殊な細胞集団の性質を反映する遺伝子群であることが示唆された。さらに、これらの遺伝子群を上流で制御する心房特異的オープンクロマチン状態を保持する重要なエンハンサー領域候補も得られた。今後は、候補制御因子による洞房結節へのダイレクトリプログラミング法の効率化を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 柳澤和輝、土井晃大、植山萌恵、馬場 藍、中尾 周、川村晃久
2. 発表標題 運動誘発性徐脈モデルマウスの洞房結節における遺伝子発現プロファイリング
3. 学会等名 第113回近畿生理学談話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳澤和輝、植山萌恵、馬場 藍、石田智明、中尾 周、川村晃久
2. 発表標題 3アドレナリン受容体の心拍制御への関与
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀬谷大貴、井原 大、白井 学、川村晃久、南沢 享、渡邊裕介、中川 修
2. 発表標題 Hey2 転写因子は右心室におけるTbx2-Mycn 経路の制御により正常心臓形態形成に働く
3. 学会等名 第26回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 相澤茉優、中原正登、石田智明、植山萌恵、中尾 周、川村晃久
2. 発表標題 新生仔マウスの心筋再生に関与する新規miRNAの探索
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 王 韵策、渡邊裕介、田中裕樹、岩瀬晃康、栗原裕基、八代健太、川村晃久、中川 修
2. 発表標題 マウス胚におけるHey2エンハンサー活性による左心室筋特異的な心筋前駆細胞集団の同定
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中谷真由、堀本嵩人、植山萌恵、中尾 周、川村晃久
2. 発表標題 洞房結節におけるエネルギー代謝依存性の電気生理学的解析
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------