

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：15101
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659112
 研究課題名（和文）生理学的アプローチによるヒト全能性幹細胞由来ペースメーカー細胞作製と再生医療応用
 研究課題名（英文）Establishment of human pluripotent stem cell-derived pace-making cells using physiological approach and its application to the regenerative medicine
 研究代表者
 久留 一郎（HISATOME ICHIRO）
 鳥取大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：60211504

研究成果の概要（和文）：ヒト ES 細胞ならびに iPS 細胞からイオンチャンネルを指標としてペースメーカー細胞の作製を試みた。BAC の HCN4 のプロモーター領域に GFP 遺伝子を導入したベクターをヒト ES 細胞に導入し、心筋分化誘導し GFP 発現が最も高いクローンを複数選別採取した。分化細胞の 5% に GFP 陽性細胞の存在を確認した。HCN4-GFP 陽性細胞を採取し、心筋特異的な収縮蛋白と HCN4 チャンネルを特異的に発現し、自動能ならびに自動能を生成するイオンチャンネルを発現した pacemaking 細胞であることを確認した。Ca トランジェントによりその HCN4-GFP 細胞からの自動能が心房筋へ伝搬した。以上から HCN4-GFP BAC ベクター搭載ヒト ES 細胞株を樹立し、ペースメーカー細胞を選択的に採取できることが判明した。

研究成果の概要（英文）：We attempted to establish the human ES cells harboring HCN4-GFP BAC vector to isolate human pluripotent stem cell-derived pace-making cells using physiological approach. We construct BAC vector harboring the knocked GFP gene into the promoter region of HCN4 gene and introduced it into human ES cells (KhES-1) to establish the several clones including clone #1. These clones expressed the pluripotent gene markers and normal karyo type of chromosome. The embryoid body derived from clone#1 to differentiate cardiac cells included the HCN4-GFP positive cells at 5% out of total human ES cells. HCN4-GFP positive cells expressed cardiac contractile proteins and HCN4 channels. HCN4-GFP positive cells expressed the several ion channels being responsible for their automaticity. The Ca transient derived from the aggregation of HCN4-GFP positive cells propagated into the HL-1 atrial cell-sheet. Taken together, we establish the human ES cells harboring HCN4-GFP BAC vector and successfully isolate the HCN4-GFP positive pacemaking cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：生理学

キーワード：human ES cells, HCN4, pacemaking cells

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は失神、

突然死や心不全を合併する不整脈であり、その治療法として機械式ペースメーカー移植

が唯一の治療法である。しかし機械式ペースメーカは電池交換手術の必要性や自律神経応答の欠如といった問題点がある。さらに外国特許であるためにペースメーカ移植に必要な医療費は少子高齢化を迎えた我が国の経済的に大きな問題でもある。2002年生物学的ペースメーカ概念が我々の教室の研究者により Nature に提唱されて以来、心臓ペースメーカ細胞を作成する試みが国内外でなされてきたが実現していない。これまで幹細胞からのペースメーカ細胞作成は発生生物学的な考え方にに基づき、発生分化に関連する分子をマーカーとして用いられてきたが、これらの分子の多くは細胞内に局在するため、抗体を用いて living cell として分取精製することが出来ない。そこで、人の心臓への移植を目的として遺伝子改変を行わず、ペースメーカ細胞を分取精製するにはその電気的な機能を担う細胞表面マーカーを用いた生理学的アプローチによる新しい技術が必要である。我々はこれまでに生理学的アプローチによりペースメーカ細胞に特異的なイオンチャンネルをマーカーとした全能性幹細胞ならびに iPS 細胞由来ペースメーカ細胞の樹立、分取精製法の確立に取り組んできた。これまでのマウス ES 細胞を用いた検討から、HCN4 というイオンチャンネルをマーカーとして ES 細胞からペースメーカ細胞を分取精製し、この細胞を組織化して、徐脈性不整脈モデルの心室に移植することで心室ペーシングに成功し、同時にペースメーカ細胞を認識する抗 HCN4 抗体を作成した。

2. 研究の目的

本研究ではマウス全能性幹細胞で得られた技術をヒト全能性幹細胞に応用することを目的とし、①ヒト全能性幹細胞（ヒト ES 細胞及び iPS 細胞）からのペースメーカ細胞分化誘導技術の確立、②抗 HCN4 抗体を用いたヒト全能性幹細胞由来ペースメーカ細胞の分取選択と陽性コントロールとしての BAC 改変ヒト全能性幹細胞の樹立、③ヒト全能性幹細胞由来ペースメーカ細胞の組織化、④徐脈モデル動物へのペースメーカ組織移植とその性能評価を行う。

3. 研究の方法

ヒト ES 細胞ならびにヒト iPS 細胞からのペースメーカ細胞分化誘導法の確立とその効率の最適化を行う。原理としては2段階の分化誘導を用い、第一段階で Wnt シグナルの阻害と BMP シグナルの阻害を行い、第二段階で FGF2 と BMP4 で処理する。ヒト ES 細胞ならびにヒト iPS 細胞をコンフルエントの状態にし、酵素処理により小型の細胞塊を作成し、マトリゲル上で培養

する。分化誘導第一段階として Wnt シグナルの阻害薬と BMP シグナルの阻害物質を添加して、分化誘導を開始し、4日間培養する。引き続き、分化誘導第二段階として酵素処理により単一細胞を作成後、96 well dish の各 well に 10000 個の細胞を巻き、BMP4 と FGF2 を添加することで分化誘導する。

4. 研究成果

(1)ヒト全能性幹細胞（ヒトES細胞及びiPS細胞）からのペースメーカ細胞分化誘導技術の確立:

ヒトES細胞は京都ヒトES細胞株3番を用い、ヒトiPS細胞はヒトTリンパ球に山中4因子をセンダイウイルスベクターを用いて導入し樹立した。これらの細胞からペースメーカ細胞を含む心筋細胞を分化誘導するために、ヒトES細胞ならびにヒトiPS細胞をコンフルエントの状態にし、酵素処理により小型の細胞塊を作成し、マトリゲル上で培養し、Wntシグナルの阻害薬(CHIR99021)とBMPシグナルの阻害物質(Noggin)を添加して、分化誘導を開始し、4日間培養する。引き続き酵素処理により単一細胞を作成後、96 well dishの各wellに10000個の細胞を巻き凝集塊を作製して、BMP4とFGF2を添加することで分化誘導した。ヒトES細胞ならびにヒトiPS細胞の分化効率は最大20~30%であった。CHIR99021(3 μ M)とNoggin(100ng/ml)でday4でstageIIへ移行し、FGFを添加することで、凝集塊が100%拍動し、分化誘導法を確立した。

(2)抗HCN4抗体を用いたヒト全能性幹細胞由来ペースメーカ細胞の分取選択と陽性コントロールとしてのBAC改変ヒト全能性幹細胞の樹立:

ヒトHCN4チャンネルのプロモーター領域を含む5kbの5'-側と3kbの3'-側をPCRで増幅した後、GFPのcDNAを持ちNeomycine耐性遺伝子とジフテリア毒素遺伝子を有する真核細胞発現ベクターのmulti-cloning siteに挿入したノックインベクターを作成する。制限酵素でベクターをlinearizeしたのち電気穿孔法でヒトESおよびiPS細胞に遺伝子導入し、Neomycinにより耐性クローンを選択した。ノックイン株が得られないために、ヒトHCN4チャンネルのプロモーター領域にGFPを連結したBACベクターを構築し、ヒトES細胞に導入し、マウスES細胞に導入し、心筋分化誘導し、GFPの発現を拍動心筋に確認してBACベクター

が作動することを確かめた。

(3)HCN4 プロモーター領域にGFPを連結した改変BACベクター搭載ヒトES細胞の樹立と分化誘導法の確立：

ヒト HCN4 チャンネルのプロモーター領域を含むBACにGFP遺伝子を連結し、電気穿孔法でヒトESに遺伝子導入し、Neomycinにより耐性クローンを選択しBAC搭載ヒトES細胞株を得た。ヒトESおよびiPS細胞からペースメーカー細胞を含む心筋細胞を分化誘導するために、ヒトES細胞をコンフルエントの状態にし、酵素処理により小型の細胞塊を作成し、マトリゲル上で培養し、Wntシグナルの阻害薬(CHIR99021)とBMPシグナルの阻害物質(Noggin)を添加して、分化誘導を開始し、4日間培養する。引き続き酵素処理により単一細胞を作成後、96 well dishの各wellに10000個の細胞を巻き凝集塊を作製して、BMP4とFGF2を添加することで分化誘導した。ヒトES細胞の分化効率は最大20~30%であった。CHIR99021(3 μ M)とNoggin(100ng/ml)でday4でstageIIへ移行し、FGFを添加することで、凝集塊が100%拍動し、分化誘導法を確立した。分化誘導によりフローサイトメータ状でHCN4-GFP発現の強い8株を樹立し、その中でクローン1(#1)を解析した。#1は正常な核型と未分化マーカーの正常な発現を確認した。分化誘導により全細胞の5%にHCN4-GFPの発現を認めた。HCN4-GFP陽性細胞をソーティングし、単一細胞ならびにその凝集塊の自律拍動を確認した。

(4)ヒトペースメーカー細胞の電気特性に関するシュミレーションを用いた検討

ペースメーカー細胞の電気特性の検討をシュミレーションモデルとの比較を用いて検討した。また、ES細胞からの心筋分化誘導効率の改善の為に、エピジェネティクス因子の一つであるHP1- γ の作用を検討し、その効果を検証した。さらに、ES細胞の未分化性を維持する細胞としてマウス線維芽細胞に変えて脂肪由来幹細胞を検討した。現在ヒトiPS細胞には同様の検討を予定している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計21件)

1. Li P, Ogino K, Hoshikawa Y, Morisaki H, Toyama K, Morisaki T, Morikawa K, Ninomiya H, Yoshida A, Hashimoto K, Shirayoshi Y, Hisatome I. AMP deaminase 3 plays a critical role in remote reperfusion lung injury. *Biochem Biophys Res Commun.* (in press)
2. Kurata Y, Hisatome I, Tanida M, Shibamoto T. Effect of Hyperpolarization-Activated Current If on Robustness of Sinoatrial Node Pacemaking: theoretical study on influence of intracellular Na⁺ concentration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*(in press)
3. Harada Y, Yamamoto Y, Tsujimoto S, Matsugami H, Yoshida A, Hisatome I. Transplantation of freshly isolated adipose tissue-derived regenerative cells enhances angiogenesis in a murine model of hind limb ischemia. *Biomed Res.* 2013;34(1):23-9
4. Morikawa K, Ikeda N, Hisatome I, Shirayoshi Y. Heterochromatin protein 1y overexpression in P19 embryonal carcinoma cells elicits spontaneous differentiation into the three germ layers. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Feb 8;431(2):225-31.
5. Suzuki S, Kurata Y, Li P, Notsu T, Hasegawa A, Ikeda N, Kato M, Miake J, Sakata S, Shiota G, Yoshida A, Ninomiya H, Higaki K, Yamamoto K, Shirayoshi Y, Hisatome I. Stabilization of Kv1.5 channel protein by bepridil through its action as a chemical chaperone. *Eur J Pharmacol.* 2012 Dec 5;696(1-3):28-34.
6. Fujii H, Ikeuchi Y, Kurata Y, Ikeda N, Bahrudin U, Li P, Nakayama Y, Endo R, Hasegawa A, Morikawa K, Miake J, Yoshida A, Hidaka K, Morisaki T, Ninomiya H, Shirayoshi Y, Yamamoto K, Hisatome I. Electrophysiological properties of prion-positive cardiac progenitors derived from murine embryonic stem cells. *Circ J.* 2012;76(12):2875-83
7. Mizuta E, Utami SB, Ohtahara A, Endo S, Mishima M, Hasegawa A, Yamada K, Kato M, Yamamoto K, Ogino K, Ninomiya H, Miyazaki S, Hamada T, Taniguchi SI, Cheng J, Hisatome I. A vasodilating β 1 blocker celiprolol inhibits muscular release of uric acid precursor in patients with essential hypertension. *Horm Metab Res.* 2013 Jan;45(1):69-73

8. Kinugawa T, Kato M, Yamamoto K, Hisatome I, Nohara R. Proinflammatory cytokine activation is linked to apoptotic mediator, soluble Fas level in patients with chronic heart failure. *Int Heart J*. 2012;53(3):182-6.

9. Hamada T, Yamada K, Mizuta E, Watanabe A, Osaki T, Ishida K, Hasegawa A, Sakata S, Mishima M, Ogino K, Nosaka Y, Miyazaki S, Ohtahara A, Ninomiya H, Kato M, Yoshida A, Taniguchi S, Yamamoto K, Hisatome I. Effects of cilnidipine on serum uric acid level and urinary nitrogen monoxide excretion in patients with hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 2012;34(7):470-3.

10. Kurata Y, Hisatome I, Shibamoto T. Roles of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ cycling and Na⁺/Ca²⁺ exchanger in sinoatrial node pacemaking: insights from bifurcation analysis of mathematical models. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012 Jun 1;302(11):H2285-300.

11. Sugiri, Sefri Noventi, Ichiro Hisatome, Udin Bahrudin Carbohydrate diet links to higher risk of significant coronary artery disease in young Indonesian patients: Cardiometabolic Investigation study *Biomedical Research* 2012; 23 (2): 159-165

12. Peili Li, Haruaki Ninomiya, Yasutaka Kurata, Masaru Kato, Junichiro Miake, Yasutaka Yamamoto, Osamu Igawa, Akira Nakai, Katsumi Higaki, Futoshi Toyoda, Jie Wu, Minoru Horie, Hiroshi Matsuura, Akio Yoshida, Yasuaki Shirayoshi, Masayasu Hiraoka, Ichiro Hisatome. Reciprocal Control of hERG Stability by Hsp70 and Hsc70 with Implication for Restoration of LQT2 Mutant Stability. *Circ Res*. 2011 Feb 18;108(4):458-68.

13. YK Ting, K Morikawa, Y Kurata, PL Li, U Bahrudin, E Mizuta, M Kato, J Miake, Y Yamamoto, A Yoshida, M Murata, T Inoue, A Nakai, G Shiota, K Higaki, E Nanba, H Ninomiya, Y Shirayoshi, I Hisatome. Transcriptional activation of SAP97 by HSF-1 stabilizes Kv1.5 in HL-1 cells. *Br J Pharmacol*. 2011 Apr;162(8):1832-1842.

14. Tanaka K, Yamamoto Y, Ogino K, Tsujimoto S, Saito M, Uozumi N, Shimizu T, Hisatome I. Cytosolic Phospholipase A2{alpha} Contributes to Blood Pressure Increases and Endothelial Dysfunction Under Chronic NO Inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 May;31(5):1133-8.

15. Higaki K, Li L, Bahrudin U, Okuzawa S, Takamura A, Yamamoto K, Adachi K, Paraguison RC, Takai T, Ikehata H, Tominaga L, Hisatome I, Iida M, Ogawa S, Matsuda J, Ninomiya H,

Sakakibara Y, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Chemical chaperone therapy: chaperone effect on mutant enzyme and cellular pathophysiology in β -galactosidase deficiency. *Hum Mutat*. 2011 Jul;32(7):843-852.

16. Nishio R, Tsuchiya H, Yasui T, Matsuura S, Kanki K, Kurimasa A, Hisatome I, Shiota G. Disrupted plasma membrane localization of equilibrative nucleoside transporter 2 in the chemoresistance of human pancreatic cells to gemcitabine (dFdCyd). *Cancer Sci*. 2011 Mar;102(3):622-9.

17. Hoshikawa Y, Kanki K, Ashla AA, Arakaki Y, Azumi J, Yasui T, Tezuka Y, Matsumi Y, Tsuchiya H, Kurimasa A, Hisatome I, Hirano T, Fujimoto J, Kagechika H, Shomori K, Ito H, Shiota G. c-Jun N-terminal kinase activation by oxidative stress suppresses retinoid signaling through proteasomal degradation of retinoic acid receptor α protein in hepatic cells. *Cancer Sci*. 2011 May;102(5):934-41

18. Ikeda R, Ishii K, Hoshikawa Y, Azumi J, Arakaki Y, Yasui T, Matsuura S, Matsumi Y, Kono Y, Mizuta Y, Kurimasa A, Hisatome I, Friedman SL, Kawasaki H, Shiota G.

Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 induced by transforming growth factor β 1 are the therapeutic targets of polyenylphosphatidylcholine in the suppression of human hepatic stellate cell activation. *Inflamm Res*. 2011 Jun;60(6):597-604.

19. Li P, Tanaka S, Ichiyonagi T, Ninomiya H, Ting Y, Utami SB, Aimi T, Shirayoshi Y, Miake J, Hisatome I. Novel effects of extracts from poisonous mushrooms on expression and function of the human ether-a-go-go-related gene channel. *Biol Pharm Bull*. 2011;34(9):1474-80.

20. Bahrudin U, Morikawa K, Takeuchi A, Kurata Y, Miake J, Mizuta E, Adachi K, Higaki K, Yamamoto Y, Shirayoshi Y, Yoshida A, Kato M, Yamamoto K, Nanba E, Morisaki H, Morisaki T, Matsuoka S, Ninomiya H, Hisatome I. Impairment of ubiquitin-proteasome system by E334K cMyBPC modifies channel proteins, leading to electrophysiological dysfunction. *J Mol Biol*. 2011 Nov 4;413(4):857-78.

21. Urashima T, Kurata Y, Miake J, Kato M, Ogura K, Yano A, Adachi M, Tanaka Y, Yamada K, Hamada T, Mizuta E, Kuwabara M, Kato M, Yamamoto Y, Ogino K, Yoshida A, Shirayoshi Y, Hisatome I. Enhancing effects of salicylate on quinidine-induced block of human wild type and LQT3 related mutant cardiac Na⁺ channels. *Biomed Res*. 2011 Oct;32(5):303-12

[学会発表] (計 3 件)

1. Kumi Morikawa $\&$ Functional integration of HCN4 positive cardiac pacemaking cells derived from mouse embryonic stem cells with recipient cardiomyocytes

第77回日本循環器学会学術総会 2013年03月15日～2013年03月17日 パシフィコ横浜

2. Udin Bahrudin ら Intracellular Ca²⁺ handling regulates the automaticity of HCN4-GFP(+) pacemaking cells derived from murine ES cells during cardiac differentiation 第77回日本循環器学会学術総会 2013年03月15日～2013年03月17日 パシフィコ横浜

3. Ysutaka Kurata ら Electrophysiological and molecular biological properties of prion-positive cardiac progenitors derived from murine embryonic stem cells. 第77回日本循環器学会学術総会 2013年03月15日～2013年03月17日 パシフィコ横浜

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：安全性の高い再生医療技術の確立

発明者：久留一郎

権利者：鳥取大学

種類：特許群

番号：G12-0053

出願年月日：2013年1月30日

国内外の別：国内

○取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者 久留 一郎

(HISATOME ICHIRO)

鳥取大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60211504

(2) 研究分担者 白吉 安昭

(SHIRAYOSHI YASUAKI)

鳥取大学・医学研究科・准教授

研究者番号：90249946

(3) 研究分担者 山本 康孝

(YAMAMOTO YASUTAKA)

鳥取大学・医学研究科・特任准教授

研究者番号：20362882

(4) 研究分担者 三明 淳一郎

(MIAKE JUNICHIRO)

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号：40372677