

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650213

研究課題名(和文) SPOCを用いた新たな心筋評価方法の開発

研究課題名(英文) The development of a diagnostic method for detecting heart defects based on spontaneous sarcomeric oscillations (SPOC) profiles from human iPS cell-derived cardiomyocytes

研究代表者

大木 高志 (OHKI, TAKASHI)

早稲田大学・理工学術院・講師

研究者番号：80443480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肥大型心筋症アクチン変異E101Kを導入したヒト心筋細胞を用いてSPOC (spontaneous oscillatory contraction) 解析を行った。E101K変異導入細胞のSPOC波形は、振幅が小さくわずかな周波数の上昇が見られた。このパラメータ異常が変異アクチンのどのような性質変化に起因するのかを調べるため、E101Kアクチンを単離精製して生化学的性質を調べたところ、フィラメント形成能は正常であるが、ミオシンとの親和性が1/3に減少していることがわかった。これらの結果から、SPOCパラメータはアクチンの性質異常を反映しており、新たな心臓疾患の診断法としての利用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：SPOC (spontaneous sarcomeric oscillations) is a characteristic state of the contractile system of striated muscle that exists between the states of relaxation and contraction. We analyzed the SPOC properties in human iPSC-derived cardiomyocytes expressing E101K mutant actin causing hypertrophic cardiomyopathy. Cardiomyocytes expressing E101K mutant showed that the sarcomere length (SL) amplitude decreases by ~37% compared to cells expressing the wild-type actin. To investigate the molecular mechanism underlying the SL amplitude decrease, E101K mutant actin was expressed by adenovirus vector in the stable C2C12 cell line expressing the adenovirus E1 gene. Actin-activated ATPase measurements using the expressed actins showed that the E101K mutation increased the Kactin for actin 3-fold, whereas the Vmax values were similar. These results suggest that reduction of the actomyosin interaction by E101K actin mutant leads to decreased SL amplitude in the SPOC state.

研究分野：総合領域

キーワード：心筋 筋収縮 SPOC アデノウイルス 肥大型心筋症

1. 研究開始当初の背景

心臓は、階層構造(心臓⇄心筋細胞⇄サルコメア⇄アクチンミオシン)を構成している臓器であり、それらがペースメーカーの周期的な電気的信号に応じて協調的に収縮することで拍動する。

SPOCとは、一定のカルシウム濃度条件下の心筋で見られる自律振動現象である¹。心筋をカルシウム溶液に一定時間さらすと、収縮・弛緩運動を周期的に繰り返す自励振動運動(SPOC)がみられるようになる。電気刺激による心筋拍動がカルシウム濃度変化を基調とした一過性収縮の反復であるのに対し、SPOCはカルシウム濃度変化から独立した、収縮機関の力学均衡によるものである。この自律振動現象の発生メカニズムは佐藤らによってモデルが提唱されており²、アクチンフィラメントとミオシンフィラメントの空間的な配置や相互作用のしやすさ、ミオシン分子のATPase活性など、SPOCはカルシウムシグナル応答を排除した収縮装置そのものの性質を反映すると考えられている。

2. 研究の目的

そこで心筋の収縮機関の評価法として、SPOCを利用できないか検討した。しかしながら1)患者のヒト心筋を直接心臓から採取することは困難であること、2)培養細胞を用いたSPOC計測は初代培養細胞が望ましいことから、ヒトiPS細胞由来の心筋細胞を用い、肥大型心筋症変異遺伝子を導入することで心筋症病態モデルとした。さらに変異タンパク質分子の性質変化によってSPOCパラメータがどのように影響を受けたか理解するため、変異タンパク質を精製し、生化学的性質を調べた。

3. 研究の方法

○ヒトiPS細胞の提供

ヒトiPS細胞(253G1株と201B7株)は理化学研究所バイオリソースセンターから提供を受けた。

○ヒトiPS細胞の培養

オンフィーダー培養: オンフィーダー用培地(DMEM(1X), Liquid(High Glucose)with GlutaMAX™-I(Life Technologies)に20% Knockout™ Serum Replacement(Life Technologies)、1x MEM Non-Essential Amino Acids(Sigma-Aldrich)、0.1 mM 2-メルカプトエタノール、5 ng/ml basic FGFを加えたもの)を使用し、SNL76_7細胞上で培養した。

フィーダーレス培養: ReproFF2培地(リプロセル社)を用い、Laminin-5(リプロセル社)吸着ディッシュで培養した。

○心筋細胞への分化

Minamiらの報告³を参考に心筋分化を行った。概略:①iPS細胞コロニーをDispaseで剥がし、24時間浮遊培養(胚様体形成)。②再びオンフィーダー培養を行い、培地に4 μM CHIR99021と2 μM BIOを加える。③3日後、10 μM KY02111と10 μM XAV939を加えた培地に交換し、10日間培養する(8-9日目に拍動が確認される)。④14-15日目の心筋細胞塊にコラゲナーゼを加え、ピペットで懸濁する。⑤Percoll濃度勾配遠心法を用いて筋線維芽細胞を除き、心筋細胞を回収する。

○心筋症変異遺伝子の導入

遺伝子導入にはAdMax™アデノウイルスベクターキット(Microbix社)を用いた。

○SPOCの測定

Ca-SPOC溶液(5 mM MgATP, 40 mM

N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid, 1 mM MgCl₂, 8.1 mM CaCl₂, 10 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 15 mM phosphocreatine, and 15 U/ml creatine phosphokinase, 4 μM thapsigargin, 200 μM ryanodine pCa 5.75, pH 7.0)に心筋細胞を浸し、25°CでSPOC測定を行った。

4. 研究成果

1. ヒトiPS細胞培養と心筋分化方法の確立

ヒトiPS細胞の培養は、フィーダー細胞上で培養するオンフィーダー培養法と、ラミニンなどの細胞外マトリックスを培養ディッシュに吸着させたフィーダーレス培養法が確立されている。そこで心筋細胞への分化が効率的に行える培養方法を検討するため、2種類のヒトiPS細胞をオンフィーダー、フィーダーレス培養で維持し、心筋への分化を試みた。ヒトiPS細胞株は、Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Mycの4因子を導入した201B7株とc-Mycを除き3因子を導入した253G1株を用いた。

心筋分化方法はMinamiらの報告³を参考にした。概略として、Wntシグナルを制御する小分子を培地に加え、心筋分化を誘導する方法で、初めの3日間はWntシグナルを阻害(CHIR99021、BIO)し、その後Wntシグナルを活性化(KY02111、XAV939)させる。細胞の分化は、ヒトβミオシン抗体と心筋トロポニンT抗体を用いた免疫染色によって確認し、約85%のコロニーにおいて心筋分化誘導が行われていることがわかった。また、同抗体を用いたイムノプロットにより、WNTシグナル阻害剤を加えた1週間以降から、次第にサルコメアタンパク質の発現が増加しているのが確認された。

	オンフィーダー培養		フィーダーレス培養	
	201B7	253G1	201B7	253G1
継代時間	3日	3日	7日	7日
拍動までの時間(平均)	8.5日	8.0日	9.5日	9.5日
拍動コロニーの割合*	82.5%±9.5%	85.2%±8.7%	75.6%±7.3%	74.2%±6.8%
心筋細胞数(x10 ⁶ 個)**	3.7±1.8	4.2±2.4	2.6±1.3	2.8±1.5

* 分化開始15日目で計測 **100mm dishから得た細胞数

表1 異なる培養方法と細胞株から得られた心筋細胞数の比較

表1の結果が示すとおり、細胞株による得られた細胞数の違いはなかったが、オンフィーダー培養の方がわずかに細胞数が多かった。そこで以下の一連の実験は、オンフィーダー法で培養した253G1株を用いた。

また胚様体形成の有無で、分化誘導効率に差があるのかも検討した(図1)。胚様体形成法は、コロニーを一度剥離し、24時間浮遊培養することでボール状の細胞塊を作らせる方法である。胚様体のまま、約2週間浮遊培養すると様々な細胞腫への分化が観察される。そこでWntシグナル制御因子を加える前に浮遊培養を行い、再び接地させてから分化誘導を行った(オンフィーダー培養ではフィーダー

細胞上に、フィーダーレス培養はラミニンコートディッシュに接地させた)。その結果、胚様体形成を経由した場合、約 8.5 日目に拍動するコロニーが確認されたが、経由しないと拍動までに約 22 日間かかり、明らかに分化誘導の効率が異なることがわかった。従って本実験では、胚様体形成を一度経由して心筋分化誘導を行うことにした。

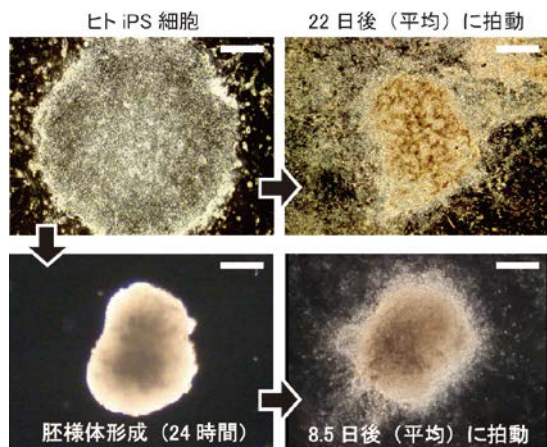


図 1 ヒト iPS 細胞から心筋細胞へ分化 (Scale bars, 0.4 mm)

2. 心筋細胞のサルコメアイメージング

心筋サルコメア長を測定するために、アクチニンの C 末端に TagRFP を結合させた蛍光アクチニン遺伝子をアデノウイルスで導入した (図 2)。サルコメア長は、蛍光アクチニンで染色された Z 線の輝度重心座標を計算し、Z 線間の距離から求めた。この距離測定を 30fps で撮影した蛍光画像で行い、サルコメア長の経時変化をプロットする。分化開始から 15 日目のヒト心筋細胞の平均サルコメア長は $1.702 \pm 0.025 \mu\text{m}$ であった。

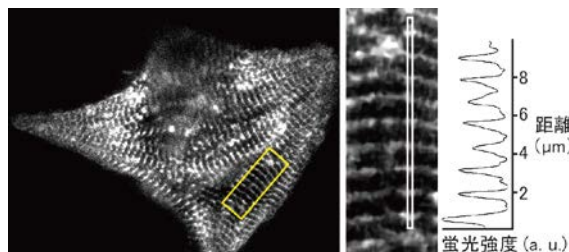


図 2 蛍光イメージングによるサルコメア長測定
得られた蛍光強度分布から輝度重心座標を計算し頂点距離からサルコメア長を算出する

3. 心筋症変異遺伝子導入

アデノウイルスベクターを用いて心筋症変異アクチニン遺伝子変異 (E101K) を導入した。E101K は家族性心筋肥大原因遺伝子で、心尖部肥大を引き起こすことが報告されている⁴。アデノウイルスベクターには心筋アクチニンの siRNA ユニットを組み込み、内在性の野生型アクチニン発現を阻害させた。また変異アクチニン遺伝子の発現が阻害されないようアデノウイルス由来のアクチニン遺伝子には siRNA 部分にサイレント変異を導入した (図 3)。

アデノウイルスベクターにより、内在性アクチニンがどの程度減少するのかを調べるため、EGFP-アクチンをコードしたアデノウイルスを感染させた心筋細胞のイムノブロットを行った (図 4a)。EGFP-アクチンの分子量は約 70kDa

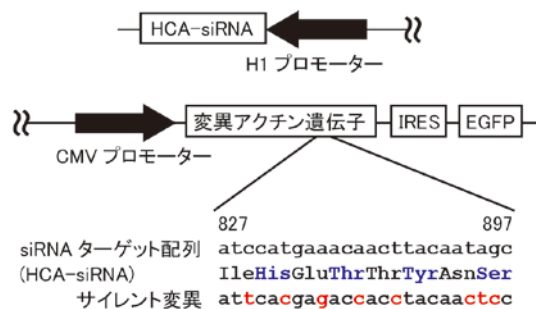


図 3 心筋症変異アクチニン遺伝子導入ベクター
内在性のアクチニン発現を阻害するため、siRNA(HCA-siRNA) 発現ユニットを組み込んだ。変異アクチニン遺伝子発現が阻害されないよう、変異アクチニン遺伝子には 8 カ所のサイレント変異を導入した。

なので、SDS-PAGE により内在性アクチニン (42kDa) と分離することができる。αアクチン抗体 (N 末端認識) で調べたところ、約 80%のアクチンが EGFP-アクチンに置き換わっていた。また EGFP-アクチンが正常にサルコメア内に組み込まれているか調べるため、アデノウイルス感染心筋細胞をグルタルアルデヒドで固定し、EGFP 抗体を用いて免疫染色を行った (図 4b)。EGFP 抗体は、ローダミンファロイジンで染色したサルコメアのシグナルと同様のパターンを示した。従ってアデノウイルス由来の EGFP-actin は正常にサルコメアに組み込まれていることがわかった。さらに心筋症変異アクチニン遺伝子である E101K-アクチンをコードしたアデノウイルスを心筋細胞に感染させて、二次元電気泳動イムノブロットを行ったところ、E101K は野生型で見られたアクチニンのスポット以外にもう一カ所スポットが確認された (図 4b)。E101K-アクチンは、グルタミン酸側鎖 (マイナス電荷) がリシン側鎖 (プラス電荷) に変異しているため、野生型アクチンよりもプラスに荷電している。図 4c は、一次元目の等電点電気泳動で E101K-アクチンが野生型と異なる移動度を示すため、2つのスポットが出現したと思われる。E101K では野生型の移動度を示すスポットが小さいことから、野生型アクチンの発現は強力に阻害されていることがわかる。これらの結果からアデノウイルスベクターは内在性アクチニン発現を減少させ、変異アクチニンを正常に発現させていることが示唆される。

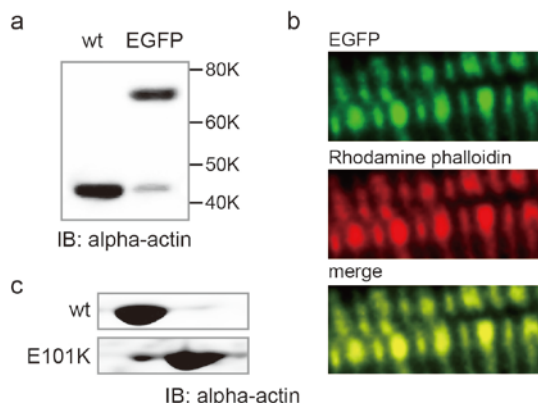


図 4 ヒト心筋アクチニンイムノブロットと免疫染色
a. EGFP-actin を発現させた心筋細胞のイムノブロット (EGFP-actin の分子量は約 70kDa) b. EGFP-actin を発現させた心筋細胞の免疫染色 (緑: 抗 EGFP 抗体、赤: ローダミンファロイジン、黄: マージ) c. actin E101K を発現させたヒト心筋細胞のイムノブロット (二次元電気泳動)

4. SPOC 測定

アデノウイルス感染心筋細胞の SPOC 測定は、Ca-SPOC 溶液（方法参照）内で、25°Cで行った。リアノジンとタブシガルギンを加えることで細胞内のカルシウム応答性を阻害し、サポニンで細胞膜透過性を上昇させた。この処理により、外液によって細胞内のカルシウム濃度を調整することができる。

野生型アクチンを発現させた心筋細胞ではサルコメア長が約 0.242 μm 変化し、その周波数は 1.59Hz だった（図 5）。それに対し、E101K-アクチンを発現させた心筋細胞では、サルコメア長変化が 0.153 μm と小さく、周波数は 1.85Hz と約 14%速かった。そこでこれらの変化が変異アクチンのどのような性質に起因するのかを調べるため、E101K-アクチンを発現精製し、生化学的性質を調べた。

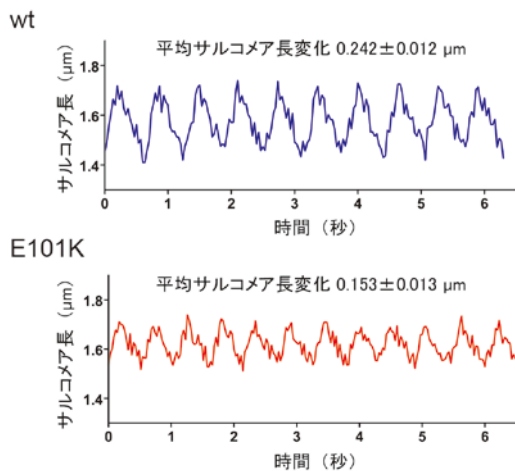


図 5 ヒト心筋細胞の SPOC 波形
振幅 (wt: 0.242 μm , E101K: 0.153 μm)、周波数 (wt: 1.59 Hz, E101K: 1.85 Hz)。測定は 0.2 mM リアノジン、4 μM タブシガルギンを加えて 25°Cで行った。

5. アクチン培養細胞発現系の構築

心筋症変異アクチンを発現させるため、マウス筋芽細胞である C2C12 細胞を用いた。経験上筋肉由来のアクチンは、非筋細胞では安定に発現することが困難である。昆虫細胞バキュロウイルス発現系を用いてアクチンを得る方法が報告⁵されているが、実際にアクチンを発現精製してみると、氷上で静置しても変性し、沈殿物が次第に発生していくのが確認された。従って昆虫細胞発現系による心筋アクチンの使用は、精製後のタンパク質の不安定さから実験結果に影響を与えてしまう危険性がある。

そこで筋芽細胞である C2C12 細胞にアデノウイルスを感染させてアクチンを得ることにした。しかしながら生化学実験に必要なアクチンを得る場合、毎回 150mm dish で 10 枚程度必要であり、その力価分のアデノウイルスを増殖させる間に RCA (増殖性アデノウイルス) が混入してくる危険性が出てきてしまう。実際に増殖を続けている (10 継

代) と、アデノウイルス粒子が高濃度で検出されるにもかかわらず、アクチン発現能が落ちていることがわかった。そこで低力価のアデノウイルスでもアクチンが過剰発現する方法を開発した。

現在我々が使用しているアデノウイルスベクターは、ウイルスゲノムの E1 と E3 領域が欠失しており、増殖には恒常的に E1 遺伝子を発現する HEK293 細胞などのパッケージング細胞が必要である。従って、C2C12 細胞に、E1 遺伝子が恒常的に発現するような仕掛けを組み込めば、低力価のアデノウイルスでも高い発現量が得られるはずである。

E1 遺伝子にコードされているタンパク質は 4 種類あるが、そのうち 3 種類 (E1A, E1B55K, E1B19K) を発現するユニットを作成し、C2C12 細胞の ROSA26 遺伝子座にノックインした (図 6)。遺伝子相同組換えには CRISPR-Cas9 システムを使用し (図 6)、ベクター (pX330-U6-chimeric_BB-CBh-hSpCas9) は Addgene (<https://www.addgene.org/>) から提供を受けた。

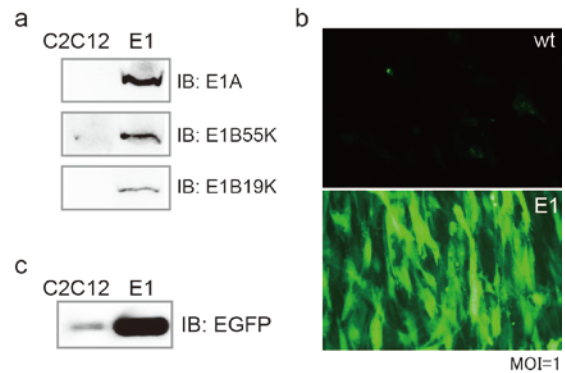


図 7 EGFP-アクチンを発現させた E1-C2C12 細胞
a. E1A, E1B55K, E1B19K 抗体を用いたイムノブロット b. EGFP-アクチン発現細胞の蛍光写真とイムノブロット (c)。アデノウイルスは MOI=1 で感染させた。

ノックイン細胞 (E1-C2C12) の E1 遺伝子発現プロファイルを図 7a に示す。E1-C2C12 細胞において 3 種類のタンパク質はすべて発現が確認された。連結 IRES 配列の下流では発現量が減少していったが、低力価 (MOI=1) アデノウイルスでもアクチンの発現量は大幅に上昇することがわかった (図 7b, c)。通常の C2C12 細胞で同程度のアクチンを発現させるには、MOI=200 程度が必要であるため、発現効率は約 200 倍上昇したことになる。また感染後の E1-C2C12 細胞培養上清にはアデノウイルスは含まれていなかった。従って E1-C2C12 細胞はアデノウイルス自身を増殖させることはなく、遺伝子発現のみ増幅させるという性質をもつことがわかった。

6. 変異アクチンの性質

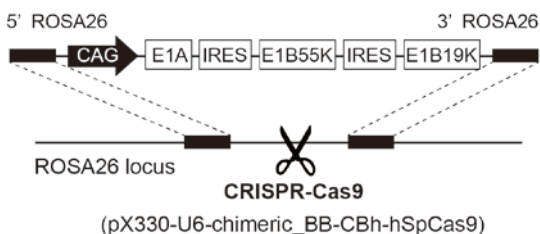


図 6 CRISPR-Cas9 システムを用いた E1 遺伝子ノックイン法
E1 遺伝子にコードされている 3 種類のタンパク質の発現ユニットを ROSA26 遺伝子座にノックインした。CAG プロモーター上流にネオマイシン耐性遺伝子も導入されている。

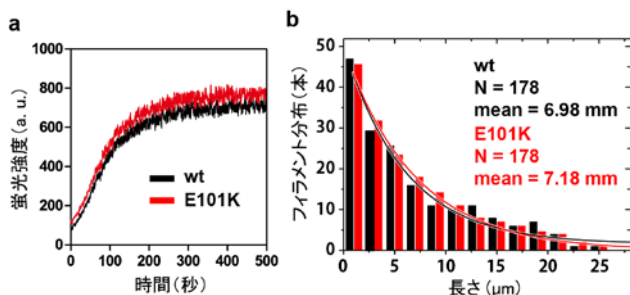


図8 E101K-アクチンの重合速度とフィラメントの長さ分布
a. アクチンの重合速度。重合速度は pyrene 蛍光上昇により測定した。b. アクチンフィラメントの長さ分布。ローダミンファロイジンで重合させたフィラメントアクチンを蛍光顕微鏡で測定した。

E1-C2C12 細胞を用いて発現させた E101K アクチンを精製し、生化学的性質を調べた。アクチンを一度脱重合させ、再び重合させる際に pyrene アクチンを混ぜておき、蛍光強度が増大する様子をプロットした (図 8a)。またフィラメントアクチンにローダミンファロイジンを加え、蛍光顕微鏡下で長さを測定した (図 8b)。これらの結果から、E101K-アクチンの重合能は野生型のアクチンと違いがないことがわかった。

次にミオシンとの結合能を調べるため、ミオシンとアクチンを混ぜ、ATPase 活性を測定した。細胞内では数 mM の ATP が存在するため、ミオシンとアクチンの結合能も ATP 存在下で測定する必要がある。ミオシンはアクチンと結合すると ATP 分解速度が速くなることが知られており、アクチンの濃度が上昇するに従って、ATPase 活性も上昇する。ATPase 活性とアクチン濃度をプロットすると、最大 ATPase 活性速度 (V_{max}) と見かけのアクトミオシンの結合定数 (K_{actin}) を求めることができる。

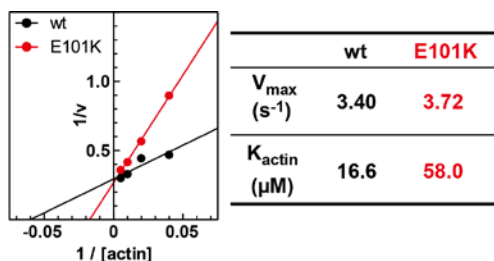


図9 アクチン活性化 ATPase 速度
アクチン濃度と ATP 分解速度 (秒) の二重逆数プロットから最大 ATPase 分解速度とミオシンとの親和性を得ることができる。25°C で測定した。

図9にその結果を示す。E101K-アクチンの ATPase 活性速度は野生型と変わらなかったが、ミオシンとの親和性が1/3に低下していることがわかった。E101はミオシンとの結合部位付近に存在しており、その付近のマイナス電荷がミオシンとの親和性に重要であることがわかっている。従って、SPOC 波形の振幅の減少はアクトミオシンの親和性低下によるものと考えられる。

我々が提案した SPOC モデル²によると、弛緩時にはサルコメアの格子構造は縮み、アクチンとミオシンは空間的に近づくため結合確率が上がる。次第にアクチンとミオシンが相互作用し始めると、ミオシンがアクチンフィラメントを引っ張り、収縮状態に近づく。サルコメアが収縮すると、格子構造が広がるため、ミオシンとアクチンは次第に解離

していく。SPOCはこの連続した弛緩-収縮状態の遷移によって起こると考えられるが、E101K-アクチンのようにミオシンとの親和性が弱いと、格子構造の広がりに伴ってアクトミオシンが解離しやすく、収縮が十分に行われたいのではないかと思われる。その結果、SPOC 波形の振幅の縮小に反映されたのではないかと予想される。

7. SPOC はサルコメア異常を検出する新たな測定法である

ヒト iPS 細胞を心筋に分化させ、SPOC を測定することに成功した。ミオシンとの親和性が低い変異アクチンが発現する心筋細胞では、SPOC 波形の振幅が小さくなっており、アクチンの性質変化が SPOC パラメータに反映されていることが示唆された。従って SPOC を調べることでサルコメアの異常を検出することができ、また試料としてヒト iPS 細胞を用いることで、将来パーソナライズドヘルスケアの観点から新たな心臓疾患の予測に利用できるかもしれない。今後さらにこれらの遺伝子変異導入細胞のデータを蓄積することで、心疾患の重篤度との相関が得られる可能性も期待できる。

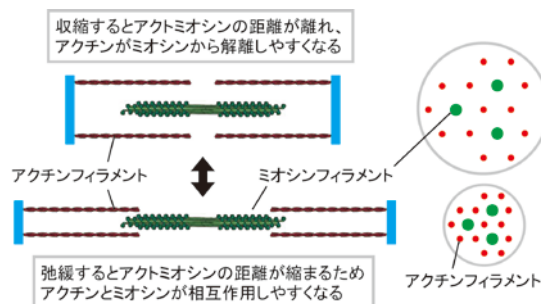


図10 弛緩時と収縮時のサルコメアの格子構造
これらの状態は隣り合ったサルコメアにも影響を及ぼす。

8. 参考文献

1. N. Fukuda, H. Fujita, T. Fujita, S. Ishiwata. (1996) *Pflugers Archiv* **433**, 1-8
2. Sato K, Ohtaki M, Shimamoto Y, Ishiwata S. (2011) *Prog Biophys Mol Biol.* **105**, 199-207
3. Minami I et al. (2012) *Cell Rep.* **2**, 1448-60
4. Monserrat L et al. (2007) *Eur Heart J.* **28**, 1953-61
5. Joel PB et al. (2004) *Biochemistry* **43**, 11554-9

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2件)

1. Miyazaki M, Chiba M, Eguchi H, Ohki T, Ishiwata S (2015) Cell-sized spherical confinement induces the spontaneous formation of contractile actomyosin rings in vitro. *Nature Cell Biology* 17(4):480-9 (査読あり)
2. Shintani SA, Oyama K, Kobirumaki-Shimozawa F, Ohki T, Ishiwata S, Fukuda N (2014) Sarcomere length nanometry in rat neonatal

cardiomyocytes expressed with α -actinin-AcGFP in Z discs. Journal of General Physiology 143(4):513-24 (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

1. 宮崎牧人、千葉雅隆、大木高志、石渡信一 (2014) 細胞サイズ液滴内でのアクチンミオシンリングの自発形成と収縮. 第 52 回日本生物物理学会年会 (札幌コンベンションセンター、北海道札幌市) 52 (S1-2) :S65, 1P190

2. 江口宙輝、宮崎牧人、大木高志、石渡信一 (2014) アクチニンで架橋された二次元アクチンネットワークのミオシン依存的な形態変化. 第 52 回日本生物物理学会年会 (札幌コンベンションセンター、北海道札幌市) 52 (S1-2) :S85, 2P169

3. 大木高志、大山廣太郎、石渡信一 (2013) ヒト遺伝性難聴(DFNA20/26) γ アクチン変異体とミオシンとの相互作用. 第 51 回日本生物物理学会年会 (国立京都国際会館、京都府京都市) 53 (S1-2) :S236, 3P149

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者 大木高志 (OHKI TAKASHI)
早稲田大学・先進理工学部物理学科・講師
研究者番号：80443480

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし