

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659502

研究課題名(和文)多能性幹細胞からの高分化型刺激伝導系心筋細胞の開発

研究課題名(英文)Development of differentiated cardiac conduction cell from pluripotent stem cell

## 研究代表者

周藤 文明(Suto, Fumiaki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：20271166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はHCN4チャンネルの細胞外エピトープを認識する抗体にR I ビーズを結合させて重たくし、セルソーターを用いて、多能性幹細胞由来の心筋細胞から刺激伝導系心筋細胞を分離する事を目指すものであり、これまでHCN4チャンネル細胞外エピトープ([1]Pos:288-293, [2]Pos:362-368, [3]Pos:442-447, [4]Pos:487-496)を標的とした抗体を4種類試したが、十分な機能は得られなかった。現在、新たなデザインで抗体を自費制作中である。

研究成果の概要(英文)：Many investigators have been trying to develop primitive not well differentiated cardiomyocytes such as pacemaker cells from pluripotent stem cell. In this project we were aiming to isolate pacemaker cells from mixed cardiomyocytes by cell sorter technique, using antibodies targeting extracellular sequence, 288-293, 362-368, 442-447, and 487-496 of HCN4 channel. However, we could not sort effective pacemaker cells using these HCN4 antibodies.

研究分野：小児循環器学

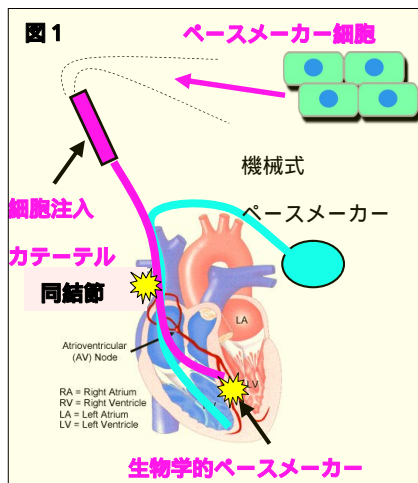
キーワード：分化型刺激伝導系細胞 多能性幹細胞 HCN4チャンネル 細胞外エピトープ

## 1. 研究開始当初の背景

### < 臨床的背景 >

米国では、年間30～40万件の心臓突然死<sup>(3)</sup>、その16%に徐脈の記録が報告されており<sup>(4)</sup>、完全房室ブロック(Complete Heart Block ; CH)を含む高度房室伝導障害の患者に、世界中で年間約50万件のペースメーカー移植が施行されている<sup>(5)</sup>。ペースメーカー再移植までの期間は平均7.3年で<sup>(6)</sup>、日本人の平均寿命は男性79.6歳、女性86.4歳(平成21年厚生労働省)に達しており、小児の生涯でのペースメーカー交換回数は多く、これに伴う身体的精神的苦痛は計り知れない。

我々は、この状況を打破するため機械式ペースメーカー移植に代わるペースメーカー細胞移植のための研究を行ってきた。すなわち、独自開発した細胞注入カテーテルを用いてCHBウサギモデル<sup>(1)</sup>に心筋細胞を注入する治療法開発を行ってきた(図1)。



しかし、現在、ペースメーカーとして用いる事の出来る細胞は、多能性幹細胞から誘導させた心筋細胞であり、作業心筋細胞や刺激伝導系心筋細胞が混在するものである。心筋細胞をさらに刺激伝導系細胞やペースメーカー細胞へと高度に分化させた細胞を開発したという報告は無い。

また、現在、臨床の場で広く行われている

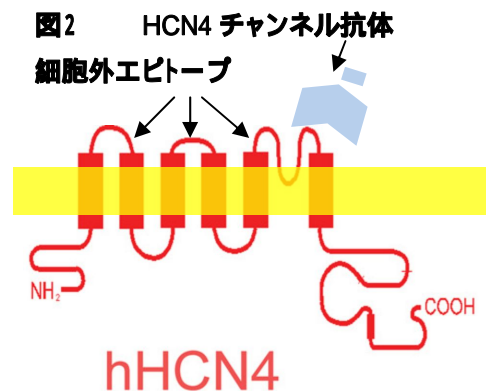
CHBに対する機械式ペースメーカーやペースメーカー細胞の移植は、房室伝導が損傷している事に対する対処療法的であり房室伝導を回復させると言う根本治療ではない。

我々は、高度に分化した刺激伝導系心筋細胞の開発の先には、刺激伝導系組織の構築による房室伝導の回復をも念頭に本研究を行っている。

### < 学術的背景 >

プリオン蛋白を細胞表面マーカーとして心筋際を誘導する方法<sup>(2)</sup>は、**ウイルスによる遺伝子導入なしにES細胞から心筋細胞を作り出すことが可能で、ウイルスを用いる方法より安全が高いものである。**

ペースメーカーチャンネルとして知られるHCN4チャンネルの細胞表面エピトープ(図2)を認識する有効な抗体は、これまで存在しなかったため、この抗体をマーカーとして多能性幹細胞から刺激伝導系心筋細胞を分離誘導する試みの報告は無い。



## 2. 研究の目的

本研究の最終的な目標は、小児期CHBにおける心臓突然死の予防法開発である。

この突然死の予防方法には、機械式ペースメーカーの代わりにペースメーカー細胞を心臓に移植する方法と、刺激伝導系細胞から刺激伝導系組織を作り、それを心臓に移植し

て房室伝導を回復させる方法がある。いずれの方法でも、高度に分化した刺激伝導系心筋細胞の分離が望まれる。

本研究では、刺激伝導系心筋細胞/ペースメーカー細胞に特異的に存在する HCN4 チャンネルを細胞表面マーカーとして、高度に分化した刺激伝導系心筋細胞を分離誘導する事を目標とする。

### 3. 研究の方法

#### 1) <多能性幹細胞からの心筋細胞の分離、誘導>

ES 細胞や iPS 細胞などの**多能性幹細胞**は心臓のように再生の難しい臓器の治療に役立つと期待されるが、多能性幹細胞から心筋細胞を作り出す際に、まだ分化していない幹細胞が混入するとガンを作ってしまう。**つまり、目的の細胞である心筋細胞だけを選び出すことが必要である。細胞の表面マーカーに対する抗体を用い、これにビーズをつけて磁気に反応させて集める装置(自動磁気細胞分離装置)を用いて細胞を効率よく選別し集めてくる事ができる。**

我々は、マウス ES 細胞を用いた解析によって、**プリオンタンパク質(PrP)**の遺伝子が心筋細胞に発現していることを見出し(図3)、

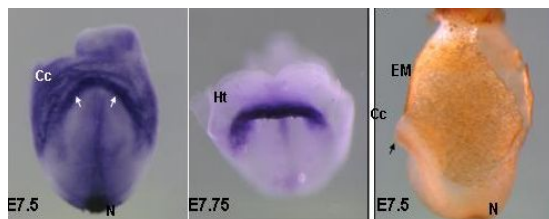
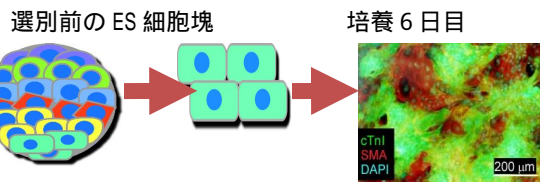


図3 異常型 PrP は BSE (牛海綿状脳症) を引き起こすが、正常型 PrP の役割はまだ判っていない。発生途中のマウス胚を調べると、PrP 遺伝子とタンパク質は将来心臓になる部分(心臓原器 Cc、矢印)で発現していた。

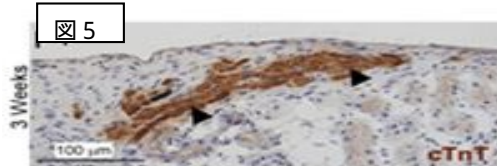
この PrP をマーカーとして心筋細胞を集め培養する方法を開発した。心筋細胞を含む細胞塊をバラバラにして、一つの細胞にした後、PrP 抗体(SPI-BIO 社

製、モノクローナル抗体)と反応させ、PrP 抗体についた磁気ビーズを利用し自動磁気細胞分離装置で細胞を集める。集め、培養した。これらの細胞を1週間培すと、cTnI を発現し自動能をもつ心筋細胞になる。(図4)

図4



安全性：PrP 抗体で選別した細胞を集めて塊りをつくらせ、免疫不全マウスの腎皮膜下に移植すると、細胞塊は3週間にわたって生存し、心筋タンパク質(cTnT)を発言したが、未選別の細胞塊を移植すると腫瘍を形成した(図5)。



#### 2) <作り出した心筋細胞の細胞膜に存在するペースメーカーチャンネル(HCN4)の細胞表面エピトープを認識する抗体を作製し、心筋細胞から HCN4 を有する刺激伝導系心筋細胞を分離誘導する。>

- 1) Suto *et al.* A novel rabbit model of variably compensated complete heart block. *J Appl Physiol.* 2002;92(3):1199-204
- 2) Hidaka K *et al.* The cellular prion protein identifies bipotential cardiomyogenic progenitors. *Circ Res.* 106:111-119, 2010
- 3) Zipes DP *et al.* Mechanisms of sudden cardiac death. *J Clin Invest* 2005 Sep;115(9):2305-15
- 4) Rubart M *et al.* Ambulatory sudden cardiac death. *Am Heart J* 1989 Jan;117(1):151-9
- 5) Moller M *et al.* Quality assessment of pacemaker implantations in Denmark. *Europace* 2002 Apr;4(2):107-12

6) Hauser *et al.* Clinical experience with pacemaker pulse generators and leads. *Heart Rhythm* 2007 Feb;4(2):154-60

#### 4. 研究成果

方法の1)にある心筋細胞の作成は分担者によって方法は確立されており、HCN4チャンネルに対する抗体が手に入り供給できる体制が敷かれていた。

方法の2)心筋細胞から高分化型の刺激伝導系細胞を分離するためのHCN4チャンネル抗体をHC4チャンネルの細胞外エピトープに該当するシーケンス(アミノ酸配列288-293番,362-368番,442-447番,487-496番)をターゲットに抗体を4種類作ったが、有効な機能を有する抗体は得られなかった。

#### 5. 主な発表論文等 該当なし

(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 件)  
[学会発表](計 件)  
[図書](計 件)  
[産業財産権]  
出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

周藤 文明(SUTO, Fumiaki)  
京都府立医科大学医学研究科、  
博士研究員  
研究者番号：20271166

##### (2)研究分担者

日高 京子(HIDAKA, Kyouko)  
北九州市立大学,教授  
研究者番号：00216681

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：