

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26501003

研究課題名(和文) HCN4イオンチャネルを指標とした心筋純化法の開発と心疾患への再生医療

研究課題名(英文) Fluorescent reporter lines in human iPS cells offer useful platforms to study cardiac subtype specification, cell-based therapies of cardiac disease and drug development.

研究代表者

白吉 安昭 (Shirayoshi, Yasuaki)

鳥取大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90249946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：心臓は、洞結節ペースメーカー細胞や刺激伝導系細胞などの特殊心筋と、心房筋や心室筋など作業心筋など、各種のサブタイプ心筋から構成されている。近年、再生医療、創薬においてヒトES/iPS細胞に由来する心筋細胞の有用性が広く認められている。しかし、これらの多能性幹細胞からの分化誘導心筋には、各種サブタイプ心筋が混在している。本研究では、これらの混在した心筋細胞集団の中から、それぞれのサブタイプ心筋を純化できる実験系の確立と、純化した各種心筋の解析、およびその再生医療あるいは創薬への応用を目標とした。

研究成果の概要(英文)：In order to use human ES/iPS cells in the fields of regenerative medicine and drug development, it is crucial to identify functionally distinct cardiac subtypes and to study their functional aspects in healthy and diseased conditions. To isolate nodal pacemaker cells and ventricular cardiomyocytes, we have established the dual cardiac fluorescent reporter human ES/iPS cells, in which HCN4 ion channel and MLC2v myosin light chain genes are knocked in with eGFP and mCherry, respectively. Isolated HCN4-eGFP-positive (HCN4+) cells expressed endogenous HCN4 and exhibited action potential characteristic of a nodal-phenotype including If current. Using imaging techniques, we demonstrated that HCN4+ cells established electrical coupling with HL-1 atrial CMs. These results demonstrated the potential of human ES/iPS cells-derived HCN4+ cells to act as a rate-responsive biological pacemaker.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：ヒトES細胞 ヒトiPS細胞 イオンチャネル 蛍光タンパク質 心筋分化 再生医療 ペースメーカー細胞

1. 研究開始当初の背景

心疾患は、心臓構成細胞が個別に障害されることによって生じ、その病態が異なるのみならず、必要とされる治療法も異なる。例えば、心室筋などの固有心筋の障害による心不全、ペースメーカー細胞など特殊心筋の異常による徐脈性不整脈などである(表1)。近年、これら心疾患の治療法として、ヒト多能性幹細胞(ES・iPS細胞)から作製した心筋細胞による再生医療が注目を集めている。実際に、徐脈性不整脈、心不全に対する再生医療として、ヒト多能性細胞から分化誘導した心筋細胞の移植実験が行われ、その有効性が示されている(Kehat, Nat Biotechnol 2004, Siba, Nature 2012)。ただ、これらの研究では、特殊心筋と固有心筋が混在した状態で移植されているのが問題である。

特殊心筋と固有心筋では発現するイオンチャネルなどが異なり心機能も異なるため、両者を高度に純化して、病態に応じて適切に用いることが望ましい。例えば、徐脈性不整脈には、ペースメーカー細胞、心不全には心室筋による治療が最善であると考えられる。しかし現状では、特殊心筋と固有心筋を区別して分化誘導することはできないため、特殊心筋や固有心筋が混在した状態で得られる。これらの解剖学的情報は、生存した状態では確認することができず、特殊心筋と固有心筋を選別して、その有効性を検証する研究は不可能であった。

HCN4 イオンチャネルは、心臓ペースメーカー細胞に特異的に発現し、自動能に關与する重要な分子である。我々は、HCN4 遺伝子座に GFP (green fluorescent protein) をノックインしたマウス改変 ES 細胞株を樹立し、HCN4 陽性細胞の可視化および選択的分取に成功した(Morikawa, PACE 2010)。分取した HCN4 陽性細胞は、心臓ペースメーカー細胞と同等の特性を示した。続いて、モデル動物へ移植すると、徐脈性不整脈が一部回復し、機械式ペースメーカーに替わる徐脈性不整脈の再生医療療法(バイオペースメーカー)として機能することを明らかにした(PCT/JP2010/066952、特願 2009-226760)。

最近の研究から HCN4 は、発生初期には心筋前駆細胞に広く発現し、その後、特殊心筋に局在し、ペースメーカー細胞で強く、刺激伝導系細胞で弱く発現することが明らかとなった(Liang, Circ Res 2013)。我々もまた、マウス ES 細胞に由来するペースメーカー細胞分画には、刺激伝導系細胞が含まれていることを明らかにしている(Fujii, Circ J 2012)。このように HCN4 を指標とすることによって、特殊心筋と固有心筋とを区別することができる。

2. 研究の目的

本研究では、特殊心筋として洞結節ペース

メーカー細胞、固有心筋として心室筋細胞を選別採取できる実験系の構築、分取した特殊心筋と固有心筋を用いた創薬への応用展開、および心筋の発生分化の制御機構の解明を目標とする。

3. 研究の方法

我々が開発した蛍光タンパク質による目的細胞の選択的可視化 - 選別採取法をヒト ES/iPS 細胞へ応用し、特殊心筋(HCN4 陽性のペースメーカー細胞)と固有心筋(Mlc2v 陽性の心室筋細胞)の純化法を開発し、心疾患に対する再生医療の有効性や創薬への応用展開の可能性を検討する。具体的には、ヒト ES 細胞(KhES1 株または KhES3 株)とヒト iPS 細胞(409B2 株)を用いて、改変細胞株を樹立する。

また、HCN4 は、成体では洞結節ペースメーカー細胞の最良のマーカーであるが、同時に、発生初期においては、心臓前駆細胞からなる第1次心臓領域(First Heart Field: FHF)のマーカーでもある。そこで、分化誘導初期の HCN4 陽性細胞を分取し、心臓前駆細胞の発生運命、そして心筋の発生分化制御メカニズムを検討する。

(1) 特殊心筋の純化法の開発:

HCN4 遺伝子座に GFP (緑色) または青色蛍光タンパク質 CFP をノックインしたヒト ES 細胞株を、BAC (Bacterial Artificial Chromosome)ベクターを用いたセミノックイン法によって樹立する。心筋分化誘導後、HCN4 陽性細胞でのみ GFP が発現するので、セルソーターにて分取することによって、洞結節型ペースメーカー細胞を選別採取する。

まず、BAC 上の HCN4 遺伝子のエクソン 1 を蛍光タンパク質で置き換えた HCN4-CFP-BACベクターを作製する(図1)。エレクトロポレーションによって、ヒト ES/iPS 細胞へ導入し、薬剤選択後、それぞれのノックイン株をゲノム PCR などでスクリーニングする。ノックイン株の中から特殊心筋、固有心筋を選択的に選別できる細胞株を以下の方法で同定する。

(特殊心筋) HCN4-CFP ノックイン株について、まず、心筋分化誘導後、拍動領域でのみ CFP の発現を確認できるかどうかでスクリーニングする。続いて、セルソーターで分画した CFP 陽性細胞が、HCN4 を発現しているか免疫染色法などで調べ、特殊心筋が可視化 選別採取できるヒト改変 ES 細胞株を同定する。

(2) 固有心筋の純化法の開発:

心室筋細胞のマーカー遺伝子である Mlc2v ミオシン軽鎖の発現を指標に、HCN4 陽性細胞とは異なる蛍光タンパク質で可視化することによって、心室筋細胞を特異的に選別採取する。

BAC-HCN4-ECFP ベクターを用いて作製

した HCN4-CFP ノックイン株をさらに改変する。具体的には、Mlc2v 遺伝子座に、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集法を用いて mCherry (赤色) 蛍光タンパク質をノックインした二重改変細胞株を樹立する (図 1)。

(固有心筋) 心筋へ分化誘導後、拍動領域でのみ mCherry を発現する細胞株を選択する。続いて、HCN4 (GFP/CFP) 発現との関連を調べるため、FCM によって解析し、HCN4 陽性細胞および mCherry 陽性のそれぞれ単独陽性細胞が得られるクローンを選択する。最後に、セルソートした mCherry 陽性細胞で、MLC2v が特異的に発現しているかどうかを確認する。

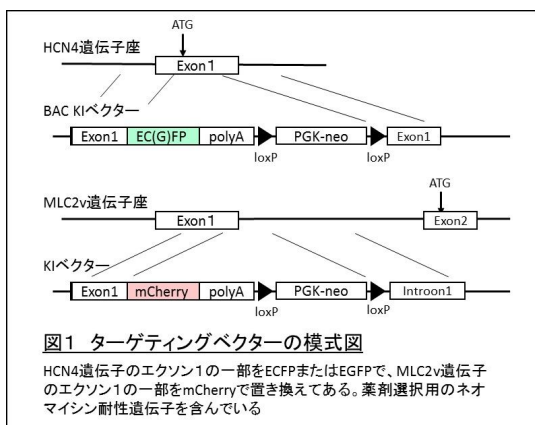


図1 ターゲティングベクターの模式図

HCN4遺伝子のエクソン1の一部をECFPまたはEGFPで、Mlc2v遺伝子のエクソン1の一部をmCherryで置き換えている。薬剤選択用のネオマイシン耐性遺伝子を含んでいる

(3) 選別細胞の評価:

ヒト ES 細胞の心筋分化誘導には山内らの2段階分化誘導法を用いた (Yamauchi, Genes Cells 2010)。

電気生理学的解析

分取した HCN4 (CFP) 陽性細胞および Mlc2v (mCherry) 陽性細胞について、パッチクランプ法を用いて電気生理学的特性を解析し、特殊心筋あるいは固有心筋が純化されているかどうかを明らかにする。

電氣的結合

選別した特殊心筋が、固有心筋と電氣的結合を形成できるか検討する。具体的には、HCN4 陽性細胞を HL1 細胞 (マウス心房筋細胞株) または分取した固有心筋と共培養する。HCN4 陽性細胞からの電気刺激が周囲の HL1 細胞などへ伝播し拍動を誘導できるかどうかを、蛍光カルシウム試薬 Fluo-8 を用いた Ca イメージング法によって検証する。

遺伝子発現

分取した HCN4 陽性細胞、Mlc2v 陽性細胞について、心臓前駆細胞 (Nkx2.5, Islet1 など)、ペースメーカー細胞 (HCN4 など)、固有心筋 (Mlc2v)、心筋の各種マーカーの発現をリアルタイム PCR および免疫染色によって定性的・定量的に評価する。

HCN4 陽性細胞の発生運命

分化誘導初期に分取した HCN4 陽性細胞

を培養し、その後の発生運命を調べる。また、培養条件と発生運命との関連を調べ、心臓発生の制御メカニズムを検討する。

HCN4 陽性細胞の各種チャンネルプロックに対する応答性の検討

比較的長期間分化誘導した HCN4 陽性細胞について、各種イオンチャンネル阻害剤に対する応答性を検討し、選別採取した HCN4 陽性細胞の創薬への応用可能性を検討する。

4. 研究成果

(1) ヒト ES/iPS 細胞株の樹立

HCN4-CFP-BAC ベクターを用いて、HCN4 遺伝子座への ECFP をノックインしたヒト ES 細胞株の樹立に成功した。さらに、この細胞株に対して、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を行い、Mlc2v 遺伝子座への赤色蛍光タンパク質 mCherry をノックインした二重改変ヒト ES 細胞株の樹立にも成功した。また、ヒト iPS 細胞に対しても同様の方法で遺伝子改変を行い、HCN4 遺伝子座に ECFP、Mlc2v 遺伝子座に mCherry をそれぞれノックインした二重改変細胞株を樹立した。(ISSCR2015、第79回日本循環器学会で発表)

(2) 特殊心筋と固有心筋の選別採取

樹立した二重改変ヒト ES 細胞株を用いて、心筋へと分化誘導したところ、誘導後 7~10 日目から拍動する心筋細胞が出現した。HCN4(CFP)の発現は、同時期に、拍動部位で特異的に観察された。また、拍動する心筋細胞数は次第に増大し、それとともに拍動の強度も上昇するが、GFP 蛍光は、拍動するほぼすべての細胞で特異的に持続し、その蛍光強度も拍動の強さとともに上昇していた。一方、Mlc2v(mCherry)陽性細胞は、分化誘導後 20 日目前後から拍動部位に現れ、その発現領域および強度は、GFP と同様に増大した。

続いて、分化誘導後 2 ヶ月目の分化誘導心筋について、CFP (HCN4)、mCherry (Mlc2v) の発現を指標として、セルソーターによって分画した。CFP 陽性、mCherry 陽性細胞と二重陽性細胞の 3 種の細胞に分画されることが分かった (図 2)。CFP 陽性細胞は、自律的に拍動し、内在の HCN4、各種心筋マーカーを発現することが分かった。現在、mCherry 陽性細胞および二重陽性細胞について、マーカーの発現を確認中である。(第 80 回日本循環器学会で発表)

なお、ヒト iPS 細胞を用いて樹立した二重改変細胞株でも、ヒト ES 細胞とほぼ同様に、GFP (HCN4)、mCherry (Mlc2v) の蛍光が拍動領域でのみ確認することができている。

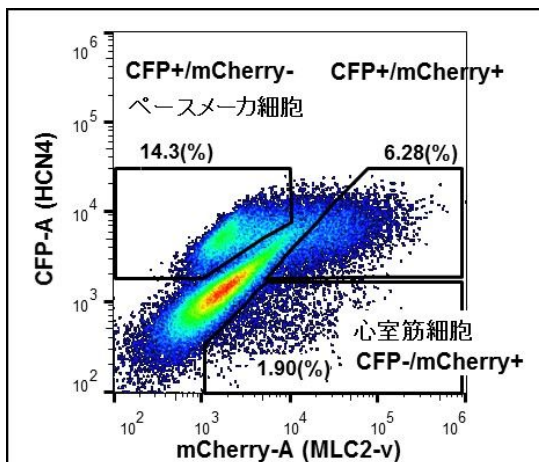


図2 分化誘導心筋のFCM解析

66日目の分化誘導心筋について、ECFP (HCN4)と mCherry (MLC2v)の発現を指標に、セルソーターを用いて選別採取した。

(3) 電気生理学的解析

分化誘導後およそ2か月半のCFP陽性細胞およびmCherry陽性細胞について、パッチクランプ法で電気生理学的特性を解析した。その結果、CFP陽性細胞は、洞結節型の自動能および活動電位を示し、If電流、HERG電流、Ca電流など、洞結節ペースメーカーでみられる各種電流を確認することができたが、Ik1などの静止膜電流は検出できなかった。一方、mCherry陽性細胞は、固有心筋型の活動電位を示し、大きなIk1電流が検出された。このように、CFP陽性細胞は、内在のHCN4の発現と合わせて、洞結節ペースメーカー細胞の、mCherry陽性細胞は、心室筋型の特性を持っていることが明らかとなった。

HCN4陽性細胞とマウス心房筋HL-1細胞を共培養すると、HL-1細胞が、HCN4陽性細胞からの電気信号に反応して自発的に発火することが、Caイメージング法によって明らかとなった。これは、ヒトES細胞に悠雷するHCN4陽性細胞が、固有心筋と電気的結合を形成でき、ペースメーカー細胞として機能することを示唆している。(第81回日本循環器学会で発表)

(4) チャネルブロッカーに対する応答性

CFP (HCN4)陽性細胞について、HERGブロッカーE-4031、KvLQT1ブロッカーchromanol293などに対する応答性を検討した。その結果、HCN4陽性細胞は、生理学的条件で、握手ブロッカーに反応することが分かった。この結果は、純化した特殊心筋を用いて、薬剤スクリーニングが可能であることを示唆している。現在、mCherry陽性細胞を用いた検討、市販されているiCellsとの比較検討を行っている。(第43回日本毒性学会で発表)

(5) 心臓前駆細胞としてのHCN4陽性細胞 最近、HCN4が、FHFのマーカである

ことが判明した。つまり分化誘導初期には、HCN4陽性細胞は、心臓前駆細胞として機能すると思われる。そこで、分化誘導初期の段階で、HCN4陽性細胞を分取し、心臓前駆細胞マーカーの発現解析、培養と分化細胞の観察、培養条件の検討を行った。

誘導後1~3週間のHCN4陽性細胞は、Nkx2.5、TBX5などの幹細胞マーカーを発現していることが分かった。一方、もう一つの心臓前駆細胞プールである第2次心臓領域(SHF)のマーカであるIslet1の発現は弱かった。また、HCN4陽性細胞を持続的に培養したところ、細胞分裂がみられること、形態的に複数種の細胞が出現してくることが分かった。さらに、初期HCN4陽性細胞の一部は、やがてmCherryを発現することも明らかとなった。これらの結果は、分取したHCN4陽性細胞が、FHF前駆細胞と同等の細胞であることを示唆している。(第39回日本分子生物学会年会で発表)

また、分化誘導時にFHFの誘導因子であるBMP4を添加するとHCN4陽性細胞比率が上るのに対して、SHFの誘導因子であるbFGFを添加するとHCN4陽性細胞の比率が減少することが分かった。このようにHCN4陽性細胞を用いることによって、心臓前駆細胞の発生運命の制御機構を検証できる可能性がある。

以上、本研究において、特殊心筋である洞結節型ペースメーカー細胞と固有心筋である心室筋細胞を選択的に可視化し、分取できる実験系の開発に成功した。また、分取したHCN4陽性細胞は、機能的にも洞結節ペースメーカー細胞と同等の特性を示し、今後の、再生医療、創薬、そして心臓発生の研究資材として、高い有用性を示していると考えている。

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3件)

1. Tatsufumi Sogo, Kumi Morikawa, Yasuaki Shirayoshi, Ichiro Hisatome et al. (14人中13番目)
Electrophysiological Properties of iPSC Cell-Derived Cardiomyocytes from a Patient with Long QT Syndrome Type 1 Harboring the Novel Mutation M437V of KCNQ1. *Regenerative Therapy* **4**, 9-17 (2016) (査読あり)
doi.: 10.1016/j.reth.2015.12.001
2. 森川久未, 白吉安昭, 久留一郎 生物学的ペースメーカーの展望 *心電図* **35**, 264-268 (2016) (査読なし)
doi.: 10.5105/jse.35.264

3. Hasegawa A, Shirayoshi Y. P19 Cells Overexpressing Lhx1 Differentiate into the Definitive Endoderm by Recapitulating an Embryonic Developmental Pathway. *Yonago Acta Med.* 58, 15-22 (2015) (査読あり)
<http://repository.lib.tottori-u.ac.jp/Repository/metadata/4996>

〔学会発表〕(計6件)

1. Yasuaki Shirayoshi, Kumi Morikawa, Kenta Fukumura, Ichiro Hisatome. Fluorescent Human iPS/ES Reporter Lines Offer the Opportunity to Track Cardiac Subtype Cells in Cell-based Therapies and Drug Development. 第81回 日本循環器学会学術集会 (2017年3月17日~19日)、「石川県立音楽堂他(石川県金沢市)」
2. 福村健太、横井文香、森川久未、野崎大蔵、久留一郎、白吉安昭 ヒトiPS細胞に由来するHCN4陽性心筋前駆細胞の解析 第39回 日本分子生物学会年会 (2016年11月30日~12月2日)、「パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)」
3. 白吉安昭、森川久未、山内香織、横井文香、福村健太、野崎大蔵、末盛博文、久留一郎 選別純化したヒト多能性幹細胞由来分化誘導心筋に関する電気生理学的特性と薬剤応答性の評価 第43回 日本毒性学会学術集会 (2016年6月29日~7月1日)、「ウインクあいち(愛知県名古屋)」
4. Yasuaki Shirayoshi, Kumi Morikawa, Jun-ichiro Miake, Ichiro Hisatome. Generation of biological pacemaker derived from human pluripotent stem cells. 第80回日本循環器学会学術集会、招待口演(トピックセッション) 2016年3月18日~20日)、「仙台国際センター(宮城県仙台市)」
5. Kumi Morikawa, Daizou Nozaki, Yasuaki Shirayoshi, Ichiro Hisatome. Isolation and characterization of HCN4 positive cells derived from human embryonic stem cells. ISSCR (2015年6月24日~27日)、「Stockholm (Sweden)」
6. 白吉安昭. HCN4 Positive Cells Derived from Pluripotent Stem Cells Show Automaticity and Pacemaking Ability. 第79回日本循環器学会学術集会、招待口演(トピックセッション) (2015年4月24日~26日)、「大阪国

際会議場他(大阪府大阪市)」

〔産業財産権〕

取得状況(計1件)

名称: 新規ペースメーカー細胞
 発明者: 久留一郎、白吉安昭、三明淳一郎
 権利者: 鳥取大学
 種類: 特許
 番号: 第 5674046
 取得年月日: 平成27年1月9日
 国内外の別: 国内

〔その他〕

鳥取大学大学院医学系研究科 機能再生医学専攻 遺伝子再生医療学講座 再生医療学分野ホームページ
<http://www.tottori-u.ac.jp/remed/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白吉 安昭 (Shirayoshi Yasuaki)
 鳥取大学・医学系研究科・准教授
 研究者番号: 90249946

(2) 研究分担者

李 佩俐 (Li Peili)
 鳥取大学・医学系研究科・助教
 研究者番号: 40464292

(3) 研究分担者

森川 久未 (Morikawa Kumi)
 鳥取大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号: 90707217