

平成27年6月4日

平成26年度共同研究報告書

京都大学再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：鳥取大学大学院医学系研究科

職名：准教授

氏名：白吉 安昭

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題：ヒト ES 細胞に由来する特殊心筋と固有心筋の選別採取法の開発とその特性解析
2. 再生医科学研究所共同研究者： 末盛 博文 准教授
3. 研究期間：平成26年4月1日～平成27年3月31日
4. 研究経過及び研究成果：

**研究経過：**

心臓を構成する細胞は、電気信号の生成と伝達にかかわる特殊心筋（ペースメーカー細胞、刺激伝導系細胞）と、電気信号に基づいて収縮する固有心筋（心房筋、心室筋）とに大別できる。ヒト多能性幹細胞を用いた既存の心筋分化誘導系では、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ていない。しかし、特殊心筋と固有心筋の異常は、異なった心疾患の原因となるため、それぞれの細胞を個別に作製し、心疾患の再生医療に用いることが望ましい。個別に細胞を調整できれば、より安全で効率の良い心疾患の再生医療療法の開発につながると考えられる。具体的には、徐脈性不整脈に対する特殊心筋による治療、心不全（心筋梗塞）に対する純化した固有心筋による治療などが期待できる。また、作製した細胞は、創薬における安全性薬理試験にも応用することが可能である。そこで、本研究では、ヒト ES 細胞から特殊心筋と固有心筋を個別に採取できる選別法の開発と採取した細胞の特性解析を目的として行った。

イオンチャネル HCN4 は、生体の洞結節ペースメーカー細胞の最良のマーカーであり、機能的にもペースメーカー細胞の自動能発生に密接に関わっている。また、近年の研究から

から、HCN4 は、ペースメーカー細胞のみならず刺激伝導系細胞のマーカーとしても有用であることが明らかとなった。つまり、HCN4 を指標とすることによって、特殊心筋全般を可視化-選別採取できるのみならず、また逆に、混在した心筋細胞から特殊心筋のみを選択的に除去し、固有心筋を選別することも可能になると考えられる。本研究では、以下の HCN4 を指標としたヒト心筋細胞の選別採取法の開発を試みた。

### (1) 特殊心筋の選別採取

BAC ベクター上の HCN4 遺伝子座に CFP (青色蛍光タンパク質) をノックインした改変 BAC ベクターを作製し、ヒト ES 細胞へ導入することによって、HCN4 陽性細胞を可視化できるヒト ES 細胞株の樹立を試みた。このヒト ES 細胞株を用いて、HCN4 陽性細胞のセルソーターによる分画を行い、特殊心筋、中でもペースメーカー細胞の分取および特性解析を行った。

### (2) 固有心筋の選別採取法の開発

当初は、HCN4 を指標に、HCN4 発現細胞をコンディショナルに除去 (選択的細胞死の誘導) できるようなヒト ES 細胞株の樹立を、BAC ベクターを利用して作製する計画であった。しかし、HCN4 が、初期の心筋前駆細胞のマーカーであることが、最新の研究から明らかとなった。このため HCN4 を用いた選択的細胞死の誘導では、心筋細胞全体が失われる可能性が高いと判断した。そこで、本研究では、心室筋に特異的ミオシン軽鎖 MLC2v を指標とすることによって、固有心筋の中の心室筋を選択的に分取できる実験系の確立を試みた。

## 研究成果：

ペースメーカー細胞と心室筋とを、選別採取できるヒト ES 細胞株の樹立を行い、目的とするヒト ES 細胞株の樹立に成功した。具体的には、BAC (Bacterial Artificial Chromosome) ベクター上の HCN4 遺伝子座に CFP をノックインした改変 BAC ベクターを用い、セミノックイン法によってヒト ES 細胞を改変した。これにより HCN4 陽性細胞で特異的に CFP を発現する株 (#21、#1 など) を複数樹立することに成功した。実際に、これらの株から心筋細胞を分化誘導し、CFP 陽性細胞を分取すると、HCN4 を発現するペースメーカー様細胞を選択的に分取できることを確認した。このように HCN4 陽性の洞結節ペースメーカー様細胞を可視化できるヒト ES 細胞株の樹立および HCN4 陽性細胞の選択的分取に成功した (Shirayoshi et al、第 79 回 日本循環器学会学術集会)。

続いて、樹立したヒト ES 細胞株に対して、CRISPER/CAS9 によるゲノム編集法を用いて、MLC2v 遺伝子座への mCherry (赤色蛍光タンパク質) のノックインを試みた。その結果、HCN4 の発現を CFP で、MLC2v の発現を mCherry で、それぞれ可視化することができる 2 重改変ヒト ES 細胞株 (#2-6、#3-8) の樹立に成功した。この細胞株から心筋を分化誘導すると、HCN4 の単一陽性細胞、HCN4 と mCherry の 2 重陽性細胞、そしてごく少量の mCherry 単一陽性細胞の 3 種類の心筋細胞を選別採取できることが分かった (Morikawa et al、ISSCR 13<sup>th</sup> Annual Meeting)。現在、これらの細胞について、遺伝子プロファイル、電気生理学的特性の解析を進めている。このように予備的な結果ではあるが、ヒト ES 細

胞から分化誘導した心筋細胞のプールの中から、特殊心筋のマーカーHCN4 と心室筋マーカーMLC2v に関して、異なった発現パターンを示す 3 種の心筋細胞を選別することに成功している。これら 3 種の心筋細胞が、どのように特殊心筋と固有心筋に対応しているのかどうかについては、今後の解析が必要であるが、本研究の主目的である特殊心筋と固有心筋の選別採取に一步近づくことができたのではないかと考えている。

## 5. 研究成果の公表

※発表論文リスト（掲載予定、プレプリントを含む。準備中も可）、学会発表等

1. Akira Hasegawa, Yasuaki Shirayoshi. P19 cells overexpressing Lhx1 differentiate into the definitive endoderm by recapitulating an embryonic developmental pathway. *Yonago Acta medica* 58, 15-22 (2015)

・採択された共同研究課題が発展したプロジェクト等  
(プロジェクト名称、主な財源、期間、概要)

1. HCN4 イオンチャネルを指標とした心筋純化法の開発とその応用、科学研究費 基盤 C、平成 26 年～28 年  
ヒト ES/iPS 細胞から HCN4 を指標として、心臓ペースメーカー細胞を選択的に分取し、その細胞を用いた新規な薬剤の安全性薬理試験の開発を目指したプロジェクト。

・学会発表

1. Tatsufumi Sogo, Takafumi Ichinose, Kumi Morikawa, Nobuhito Ikeda, Yasuaki Shirayoshi, Yutaka Kurata, Junichiro Miake, Kazuhiro Yamamoto, Shinsuke Yuasa, Keiichi Fukuda, Ichiro Hisatome. Electrical Properties of Human iPS cell-derived cardiac Myocytes from the patient with Long QT syndrome harboring a novel mutation of KCNQ. 第 31 回 日本心電学会学術集会、東京 (2014 年 7 月).

2. Yasuaki Shirayoshi, Kumi Morikawa, Junichiro Miake, Ichiro Hisatome

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、トピックセッション、大阪 (2015 年 4 月)

3. Kumi Morikawa, Daizou Nozaki, Yasuaki Shirayoshi, Ichiro Hisatome

Isolation and characterization of HCN4 positive cells derived from human embryonic stem cells. ISSCR 13<sup>th</sup> Annual Meeting, Stockholm, Sweden (2015 年 6 月 予定)