慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	ヒトiPS細胞を利用した心臓領域特異的心筋細胞および心内膜細胞の誘導法開発
Sub Title	Development of induction protocol for cardiac field-specific cardiomyocytes and endocardial cells using human iPS cells
Author	古道, 一樹(Kodō, Kazuki) 芝田, 晋介(Shibata, Shinsuke) 湯浅, 慎介(Yuasa, Shinsuke) 山岸, 敬幸(Yamagishi, Hiroyuki)
Publisher	
Publication year	2020
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2019.)
JaLC DOI	
Abstract	心臓発生において、左右の心室の心筋細胞は異なる前駆細胞から分化することが知られている。しかし、これまでヒトの心筋前駆細胞をその種類ごとに多能性幹細胞から誘導し、単離する方法は明らかにされていない。心筋前駆細胞に特異的に発現する2種類の心臓転写因子に蛍光タンパクを結合した融合蛋白を発現させ、切断するシステムの開発を目指した。NKX2.5、ISL1、PPP1R12Cという3種の遺伝子領域に、それぞれ目的のレポーター遺伝子をノックインすることに成功した。しかしP2A結合ペプチドを用いたシステムは作用せず、2種の遺伝子を同時に発現させるIRES2システムを用いることが有用と考えられた。 In cardiac development, it is known that the left and right ventricular cardiomyocytes are derived from different progenitor cells. However, the protocol for inducing and isolating different types of human cardiac progenitor cells from pluripotent stem cells has not been elucidated. We aimed to develop a system that expresses a fusion protein between a fluorescent protein and two cardiac transcription factors. Each cardiac transcription factor is specific to each cardiac progenitor cell that supplies the right or left ventricular myocardium. The target reporter gene was successfully knocked-in to three targeted gene regions, NKX2.5, ISL1, and PPP1R12C. However, the system using a binding peptide called P2A did not work, and instead of P2A peptide, it was recommended to use of the IRES2 system, which expresses two different mRNAs simultaneously using the same promoter.
Notes	研究種目：基盤研究 (C) (一般) 研究期間：2017～2019 課題番号：17K10151 研究分野：心臓発生学・ 幹細胞医学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_17K10151seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ５ 月 ２９ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：１７Ｋ１０１５１

研究課題名（和文）ヒトiPS細胞を利用した心臓領域特異的心筋細胞および心内膜細胞の誘導法開発

研究課題名（英文）Development of induction protocol for cardiac field-specific cardiomyocytes and endocardial cells using human iPS cells

研究代表者
古道　一樹（KODO, Kazuki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：１０３３８１０５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,500,000円

研究成果の概要（和文）：心臓発生において、左右の心室の心筋細胞は異なる前駆細胞から分化することが知られている。しかし、これまでヒトの心筋前駆細胞をその種類ごとに多能性幹細胞から誘導し、単離する方法は明らかにされていない。心筋前駆細胞に特異的に発現する2種類の心臓転写因子に蛍光タンパクを結合した融合蛋白を発現させ、切断するシステムの開発を目指した。NKX2.5、ISL1、PPP1R12Cという3種の遺伝子領域に、それぞれ目的のレポーター遺伝子をノックインすることに成功した。しかしP2A結合ペプチドを用いたシステムは作用せず、2種の遺伝子を同時に発現させるIRES2システムを用いることが有用と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
心室特異的な心筋細胞発生の分子・細胞レベルでの機序解明および心室特異的心筋細胞の分化誘導法の確立は、左心室と右心室の心筋の性質的差異を明らかにすることによる、心室特異的な心不全治療法開発への貢献、再生医療の実現に向けて強力な知見を提供できるインパクトを持つ。今回の研究機関に、ヒトiPS細胞から分化誘導した心筋前駆細胞の単離に用いる蛍光タンパクについて、従来広く用いられてきたP2Aペプチドを用いた融合タンパクの発現が適さないことが明らかとなった。今後IRES2という、2種のmRNAを同時に生成する方法を用いたシステムを用いることにより、左右心室特異的な心臓前駆細胞単離の実現が期待される。

研究成果の概要（英文）：In cardiac development, it is known that the left and right ventricular cardiomyocytes are derived from different progenitor cells. However, the protocol for inducing and isolating different types of human cardiac progenitor cells from pluripotent stem cells has not been elucidated. We aimed to develop a system that expresses a fusion protein between a fluorescent protein and two cardiac transcription factors. Each cardiac transcription factor is specific to each cardiac progenitor cell that supplies the right or left ventricular myocardium.
The target reporter gene was successfully knocked-in to three targeted gene regions, NKX2.5, ISL1, and PPP1R12C. However, the system using a binding peptide called P2A did not work, and instead of P2A peptide, it was recommended to use of the IRES2 system, which expresses two different mRNAs simultaneously using the same promoter.

研究分野：心臓発生学・幹細胞医学

キーワード：心筋前駆細胞　iPS細胞　ゲノム編集　心臓領域

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

１．研究開始当初の背景

右心不全は、体静脈のうっ血から来る浮腫、腹水や不整脈、臓器不全を引き起こし、心疾患の長期予後を左右する因子として近年注目されている。右心不全の原因として、虚血性心疾患、肺高血圧症や先天性心疾患の術後遠隔期合併症が考えられる。左心不全に用いる抗心不全薬が右心不全に無効であることが問題となっており、右心室独自の調節機構の存在が疑われる。右心不全症例の QOL、予後を改善するためには、左右心室筋の異なる分子機構の解明を再生医療に応用した、新たな治療法の確立が望まれる。

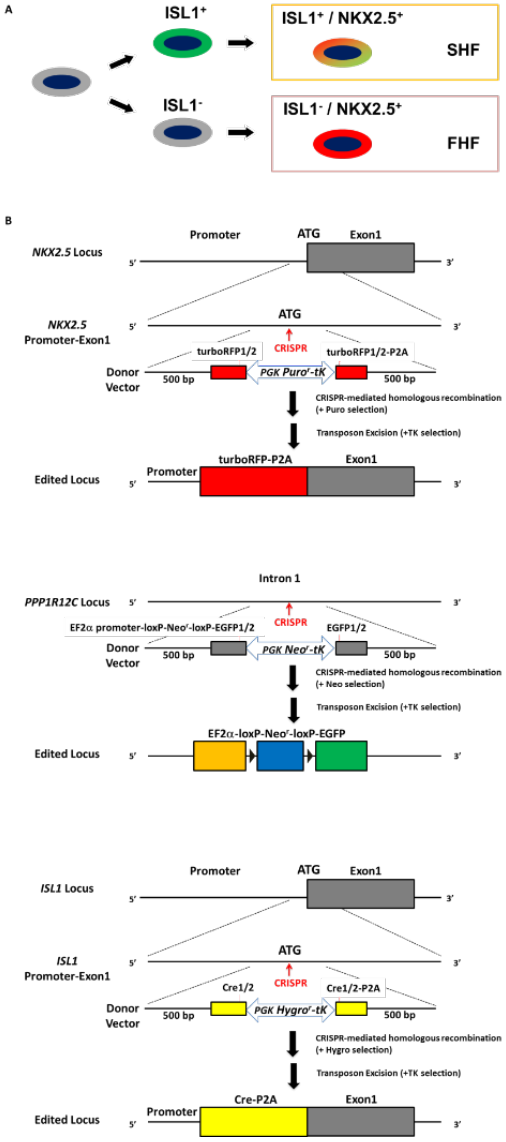
２．研究の目的

本研究の目的は、ヒト人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell: iPSC)を利用して、(1)左右心室筋細胞・心内膜細胞を選択的に分化誘導するためのシグナル制御機序、および(2)ヒト左右心室筋細胞・心内膜細胞固有の表現型を明らかにすることである。心臓の再生医療にはヒトにおける心臓構成細胞の発生機序解明が必須であるが、胎児を用いた研究が困難であるため、その詳細は未だ明らかにされていない。胎児組織に代わり、ヒト iPS 細胞の分化過程を解析することにより、従来の動物実験では明らかにされていない、ヒト特有の左右心筋細胞・心内膜細胞の発生機序および特性を解明し、右心不全や弁膜症の病態解明および再生医療への応用を目指す。

３．研究の方法

(1) 左右心室特異的心筋前駆細胞を判別するためのレポーターiPS 細胞の作製

過去の心臓発生研究で得られた知見により、左室心筋は一次心臓領域、右室心筋は二次心臓領域と呼ばれる心臓前駆細胞に由来することが明らかとなっている。一次心臓領域、二次心臓領域にそれぞれ特異的に発現する遺伝子の制御領域を利用して、蛍光タンパクを発現させることにより、心筋分化過程で各心臓前駆細胞を選別可能な iPS 細胞の作製を目指した。本研究では特に右心不全治療への知見を得るためのツールを提供できるように、二次心臓領域細胞の選別に主



【図 1】二次心臓領域由来心臓前駆細胞単離用 reporter iPS 細胞の作製

(A) dual reporter system の概略：心臓前駆細胞全般に発現する転写因子 NKX2.5 に加えて、二次心臓領域細胞に特異的に発現する転写因子 ISL1 を利用する。赤緑二つの蛍光タンパクを同時に発現する(NKX2.5⁺ISL1⁺)二次心臓領域細胞を選別可能とする。

(B) PiggyBac system を用いた相同組み換えベクター：NKX2.5 遺伝子の開始コドン直前に turboRFP-P2A 配列を導入する Homology-directed repair (HDR) ベクター(上段)、ヒトにおける安定した外来遺伝子発現を可能とする PPPIR12C intron1 に EF1a promoter-loxP-Neo 耐性遺伝子-loxP-EGFP を導入する HDR ベクター(中段)、および ISL1 遺伝子開始コドン直前に Cre-P2A 配列を導入する HDR ベクター(下段)を示す。

眼を置いたが、当初の全心臓前駆細胞を標識するNKX2.5と一次心臓領域細胞を標識するTBX5を用いた系では、十分量の二次心臓領域細胞を選別できないことが明らかとなった。そのため、二次心臓領域細胞を特異的に標識する遺伝子を利用した系の再構築を目指した。

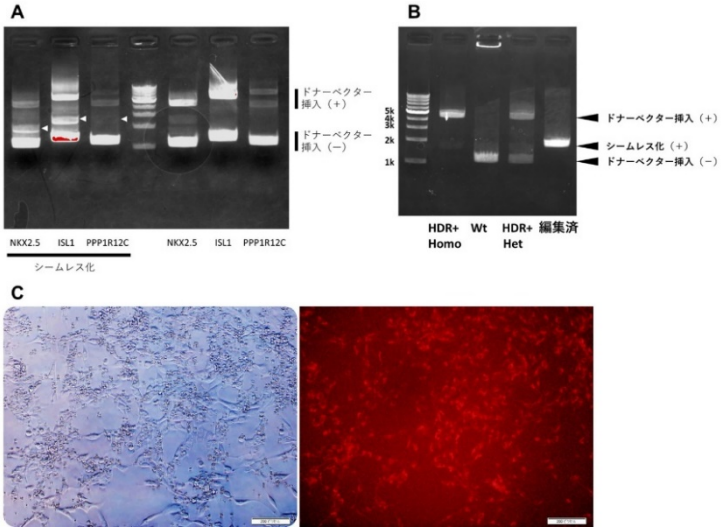
具体的には、CRISPR/Cas9システムとPiggyBac transposonを用いて、シームレスにNkx2.5遺伝子の開始コドン直前にP2A配列で結合したturboRFP蛍光タンパク遺伝子を、ISL1遺伝子の開始コドン直前にP2A配列で結合したCreを、さらにPPP1R12C遺伝子のイントロン(ヒトにおける遺伝子発現のsafety site)にCreを発現した細胞に恒常的に緑色蛍光タンパクを発現させる、EF1a-loxP-Neo-loxP-EGFP配列を挿入したtriple transgenic reporter iPS細胞の樹立を試みた。また、研究結果の項目で述べるように、さらなる改良を必要としたため、mRuby蛍光タンパク遺伝子をNKX2.5の開始コドン直前に、EGFP緑色蛍光タンパク遺伝子をISL1の開始コドン直前に、それぞれIRES2配列を介して挿入したdouble transgenic reporter iPS細胞の樹立を目指した。CRISPR/Cas9を利用した配列特異的DNA切断にはpSpCas9-GFPプラスミドを用いた。PiggyBac transposonを利用したドナーベクター作製にはPB-MV1-puroプラスミドを用いた。各ドナーベクターの設計を図１に示す。ベクターの細胞への導入はリポフェクションで行い、puromycinによるselection後にPCRおよびdirect sequenceで正確な相同組み換えの有無を確認した。シームレス化のために、excision-only piggyBac transposase mRNAをリポフェクションし、不要なセレクション配列を切断した。

(2)心内膜特異的遺伝子発現パターンを利用した心内膜細胞判別レポーターiPS細胞株の作製

過去の心臓発生研究で、胎児心内膜細胞にPECAM1とNFATC1遺伝子の組み合わせの発現が認められることが明らかになっている。この知見を用いて、iPS細胞より内皮細胞系列を分化誘導する過程で、心内膜の特性を持った細胞を単離するシステムを構築することを目指した。(1)と同様に、CRISPR/Cas9を用いて、PECAM1遺伝子の開始コドン直前にtagRFP蛍光タンパク発現遺伝子とP2A配列、NFATC1遺伝子の開始コドン直前にEGFP遺伝子とP2A配列の挿入を試みた。

４．研究成果

(1)はじめに、各トランスジーンを個別にゲノム編集し、それぞれ単一の遺伝子改変が行えるか確認した。ゲノム編集を行ったiPS細胞をセレクションし、ゲノムを抽出後、ゲノム編集領域をすべて増幅可能なプライマーでPCRを行ったDNA産物の電気泳動の結果を図2Aに示す。各トランスジーンは正確にゲノム編集され、かつexcision-only piggyBac transposase mRNAによって抗生物質耐性遺伝子が切り出され、シームレス化していることが確認された。レポーター遺伝子が正しく動作するか確認するため、turboRFP-P2Aトランスジーンをゲノム編集したシングルセルコロニーから解析用のライン(turboRFP-P2A-)を樹立した（図2B)。GSK3b阻害剤およびWnt阻害剤を用いたmonolayer法を用いて、樹立したiPS細胞株を心筋分化誘導したところ、赤色蛍光の安定した発現が確認されず、蛍光が観察されてもすぐに消退してしまう現象が認められた（図2C)。HEK293細胞を用いてトランスジーンの切断効率を評価したところ、P2Aの切断が部分的にしか認められず、発現の妨げとなっている可能性が疑われた。また、ゲノム編集を行うための、リポフェクションや、シングルセルコロニー化、さらには抗生物質によるセレクション過程で、iPS細胞にストレスが加わることは避けられず、多能性に影響をおよぼした結果、樹立した細胞株の分化能が低下する現象が認められた。トリプルトランスジェニックラインを樹立するためには、同様の過程を3回行う必要があり、たとえゲノム編集が完了したとしても、樹立されたiPS細胞株が、本来の多能性を維持している可能性は低いことが予想された。



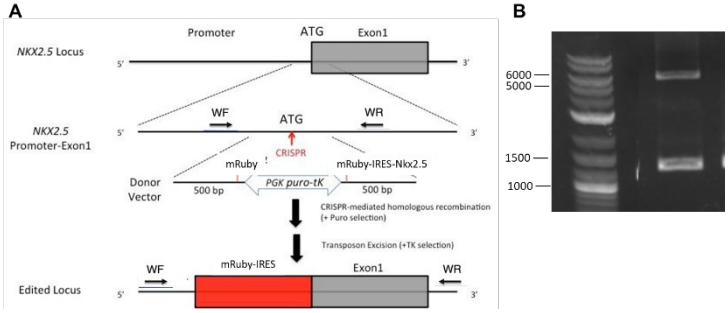
【図2】turboRFP-P2A-NKX2.5 iPS細胞株の樹立

(A) 3種類のドナーベクターをそれぞれゲノム編集したiPS細胞のbatch PCR結果を示す。各ドナーベクターがターゲットとした各領域に挿入され、excision-only piggyBac transposaseで不要な配列が切り出されている様子が確認された。

(B) turboRFP-P2A-NKX2.5 iPS細胞をシングルセルコロニーで純化した結果

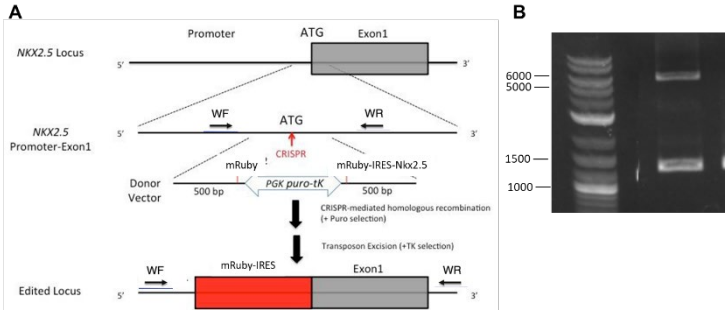
(C) monolayer法を用いた心筋分化誘導開始後12日に認められた一過性の赤色蛍光タンパク発現

この結果を踏まえ、P2A の代わりに IRES2 配列を用いて、蛍光タンパクとマーカー遺伝子を独立した mRNA として転写するシステムを新たに作成する必要、さらにはゲノム編集回数を減らし、iPS 細胞の多能性を保つ必要が生じたため、ドナーベクターの再構築を行った。turboRFP の細胞毒性リスクを回避するため、蛍光タンパクとしては mRuby を、また蛍光タンパクと転写因子を介在する配列を P2A から IRES2 に変更したドナーベクターを作成し、同様の手法を用いてゲノム編集を新たに行った(図 3)。ヘテロ接合性にゲノム編集が行われたシングルセル由来のラインが樹立されたことを確認した。ISL1 に関しては、Cre を用いた恒常的発現システムを断念し、NKX2.5 と同様に IRES2 を用いて、ISL1 の発現に従い EGFP を一過性に発現する戦略へ切り替えた。今後 excision-only piggyBac transposase によるセレクションマーカー配列の切り抜きを行う予定である。



【図 3】CRISPR/Cas9 を利用した Nkx2.5 遺伝子へのレポーター遺伝子挿入 (A) ゲノム編集の概略 (B)ゲノム編集後のトランスジーン挿入箇所を全長増幅可能な PCR 結果を示す。ヘテロでトランスジーンが挿入されていることが確認された。

(2)心内膜細胞単離用の iPS 細胞を作製するためのドナーベクター作製は、(1)と並行して行ってきたため、蛍光タンパク遺伝子とマーカー遺伝子の接続部位は P2A 配列となっている。(1)と同様の手順で、tagRFP-P2A トランスジーンを PECAM1 遺伝子の開始コドン直前に挿入した(図 4)。ドナーベクターのターゲットサイトへの相同組み換え、およびその後の piggyBac transposase によるセレクション配列除去が完了した。最終的な DNA 配列を direct sequence により確認し、目標の配列を得たことを確認した。今後、iPS 細胞の血管内皮細胞への分化を行い、PECAM1 発現とともに tagRFP が発現していることを確認する。また、心内膜細胞特異的な標識を実現するために NFATC1 遺伝子についてのゲノム編集を行う予定である。



【図 4】CRISPR/Cas9 を利用した Nkx2.5 遺伝子へのレポーター遺伝子挿入 (A) ゲノム編集の概略 (B)ゲノム編集後のトランスジーン挿入箇所を全長増幅可能な PCR 結果を示す。ヘテロでトランスジーンが挿入されていることが確認された。

以上のように、期間内にレポーターiPS 細胞株の樹立は完成に至らなかった。P2A を用いた蛍光タンパク発現の不確実性と、繰り返しのゲノム編集に伴う、iPS 細胞の劣化が障害となり、大幅にゲノム編集戦略を変更せざるを得なかった点が、計画を遅らせる原因となった。一方で、ゲノム編集によるトランスジーンのノックインは、心臓前駆細胞や心内膜細胞の単離に鍵となる因子の DNA 領域に正確に行うことが可能であった。今後、レポーターiPS 細胞の樹立に向けて検討を重ね、本来の研究目的である、将来的な心不全や弁膜症治療への再生医療の応用に向けた、新たな知見提供を目指していく予定である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計4件（うち招待講演　4件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 古道　一樹
２．発表標題 iPS技術を用いたヒト心筋発生研究と心筋疾患モデルへの応用
３．学会等名 第27回日本小児心筋疾患学会学術集会（招待講演）
４．発表年 2018年

１．発表者名 古道　一樹
２．発表標題 Patient specific iPS cell technology reveals abnormal activation of TGFβ signaling as a pathogenesis of left ventricular non-compaction cardiomyopathy
３．学会等名 第95回日本生理学大会（招待講演）
４．発表年 2018年

１．発表者名 古道　一樹
２．発表標題 iPS Cell Technology for Lifelong Cardiology in Developmental Defects of Myocardium
３．学会等名 第82回日本循環器学会学術集会（招待講演）
４．発表年 2018年

１．発表者名 古道　一樹
２．発表標題 Study of Embryonic Myocardium Development using iPS Cells-Derived from Patients with Left Ventricular Non-compaction Cardiomyopathy
３．学会等名 ConBio 2017（招待講演）
４．発表年 2017年

〔図書〕　計1件

１．著者名 野村征太郎、木岡秀隆、松島将士、山田憲明、山田臣太郎、相馬雄輔、遠山周吾、伊藤正道、片桐美香子、八木宏樹、片岡雅晴、名越智古、古道一樹、山岸敬幸、尾上健児、石田純一、関倫久、木田圭亮、足利光平	４．発行年 2020年
２．出版社 羊土社	５．総ページ数 202
３．書名 もっとよくわかる！循環器学と精密医療	

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	芝田　晋介 (SHIBATA Shinsuke) (70407089)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612)	
研究分担者	湯浅　慎介 (YUASA Shinsuke) (90398628)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612)	
連携研究者	山岸　敬幸 (YAMAGISHI Hiroyuki) (40255500)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授 (32612)	