

平成 29 年 4 月 26 日

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点
平成 28 年度共同研究報告書

京都大学ウイルス・再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）
所属：鳥取大学医学系研究科
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：ヒト多能性幹細胞からの各種心筋細胞の選択的分取とその解析および心臓の再構成
2. ウイルス・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 28 年 4 月 1 日～平成 29 年 3 月 31 日

4. 研究経過及び研究成果：

ヒト iPS/ES 細胞を用いた心筋分化誘導系では、各種サブタイプ心筋が混在した状態で分化誘導される。そこで、本研究では、サブタイプ心筋、特に洞結節ペースメーカー細胞（HCN4 陽性）と心室筋細胞（MLC2v 陽性）とを選択的に分取できる実験の系の構築と、純化した各種心筋の特性解析、それらを用いた心臓の再構成を目標とした。

ヒト iPS 細胞 409B2 株を用いて、①HCN4 遺伝子のエクソン I に GFP（緑色蛍光タンパク質）を挿入した BAC（Bacterial Artificial Chromosome）ベクターを用いて、HCN4 発現細胞を GFP で、同時に、②CRISPR/Cas9 によるゲノム編集法によって MLC2v のエクソン I に mCherry をノックインし、MLC2v 発現細胞を mCherry（赤色蛍光タンパク質）で、可視化できる二重改変 iPS 細胞株を樹立した。この細胞株を用いて心筋を分化誘導し、GFP と mCherry の蛍光を指標に心筋を分画すると、GFP 陽性細胞は、洞結節ペースメーカー細胞型の、mCherry 陽性細胞は、心室筋型の電気生理学的特性を示すことが分かった（第 81 回日本循環器学会学術集会、Shiaryoshi et al, 論文準備中）。また、この HCN4 陽性細胞は、HL1 などの心房筋細胞と電氣的に結合

し、それらの拍動を制御できることも見出している。

HCN4 は、成体のペースメーカー細胞の最良のマーカであるが、同時に、一次心臓領域 (FHF) に存在するプロジェニター細胞のマーカでもある。事実、分化誘導初期の HCN4 陽性細胞は、分裂能を持ち、その後、ペースメーカー細胞と心室筋用細胞とに発生できることがわかった (第 39 回日本分子生物学会年会)。

最後に、これらの心筋による心臓の再構成までは到達しなかったが、HCN4 陽性細胞の各種イオンチャネルブロッカーに対する応答能を市販心筋と比較したところ、ほぼ同等の結果が得られ、創薬安全性試験への応用可能性が示唆された (第 43 回日本毒性学会学術年会)。

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、特許取得等

発表論文

Yasuaki Shirayoshi, Kumi Morikawa, Shinichi Itou, Yu Ikeuchi, Natsumi Shimizu, Akira Fujii, Tadahiro Nomura, Nobuto Ikeda, Yoshinori Yosida, Lee, Ichiro Hisatome. HCN4 is efficient maker for creating biological pacemaker. (投稿準備中)

学会発表

1. 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 日本毒性学会学術年会 (2016 年 6 月 29 日~7 月 1 日) ウィンクあいち、名古屋
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、横浜
3. 山本堅士郎、丹野翔伍、足立真彩、森川久未、大月優樹、大谷直由、陶山淑子、八木俊路朗、荻野和秀、三明淳一郎、白吉安昭、山本一博、西村元延、久留一郎。虚血性心不全モデルに対する脂肪幹細胞シートと心不全薬の併用効果の検討。第 16 回 日本再生医療学会総会 (2017 年 3 月 7 日~9 日) 仙台国際センター、仙台
4. 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、金沢

5. Fluorescent reporter lines in human iPS cells offer useful platforms to study cardiac subtype specification, cell-based therapies of cardiac disease and drug development. Yasuaki Shirayoshi, Kenta Fukumura, Kumi Morikawa, Ichiro Hisatome. ISSCR2017, June 14-17 (2017), BOSTON, USA