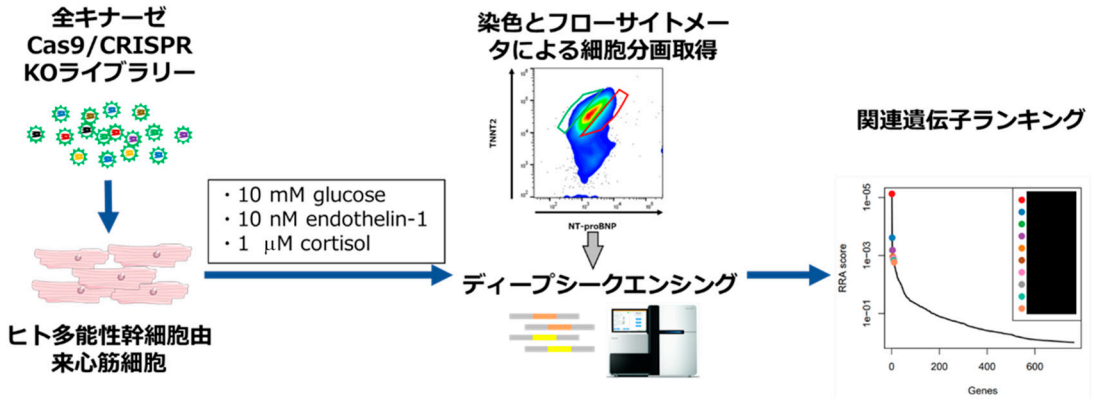
177　多能性幹細胞を用いた拡張不全型心不全の分子機序解明	木谷　友哉

【目的】心不全に対する治療法の進歩に伴い、心不全患者の予後やQOLは大きく改善してきた。しかし、現在の標準的治療薬として用いられるβ遮断薬やレニンアンジオテンシン系阻害薬は収縮不全を伴った心不全においては高い有効性を示すものの、高齢者の心不全の主体である拡張不全型心不全では有効性が乏しいことが明らかになっている。そのため新規の治療薬開発が必要であるものの、拡張不全型心不全の病態は未だに不明な点が多く残されており、治療標的の同定も困難な状態である。そこで本研究では、ヒト多能性幹細胞より心臓構成細胞を作出し、CRISPR/Cas9システムを用いた遺伝子ノックアウトスクリーニングを行い、拡張不全型心不全の病態に寄与する遺伝子の候補を探索することで、新規治療標的となりうる分子生物学的機序を明らかにすることを目的して研究を実施した。

【方法】健常人由来のヒト人工多能性幹(iPS)細胞に対して、CRISPR/Cas9システムによるゲノム編集を用いてAAVS1領域に誘導性 Cas9 発現配列を組み込んだ iPS 細胞株を複数作製した。これらの細胞株にドキシサイクリン添加を行い、フローサイトメトリーおよび免疫染色にて Cas9 の発現確認を行った。ヒト心臓線維芽細胞はヒト iPS 細胞より Wnt パスウェイ関連低分子化合物およびレチノイン酸を用いて心外膜系譜細胞を誘導し、線維芽細胞成長因子を用いて誘導を行った。リアルタイム PCR、フローサイトメトリーによる遺伝子発現および顕微鏡による形態観察にてヒト心臓線維芽細胞の評価を行った。ヒト心筋細胞はヒト iPS 細胞より Wnt パスウェイ関連低分子化合物により誘導を行い、Wnt アゴニスト存在下の低密度培養で増殖を行ったのちに実験に使用した。全キナーゼを標的とした遺伝子ノックアウト Cas9 レンチウイルスプールライブラリーより作製したレンチウイルスベクターをヒト心臓線維芽細胞、ヒト心筋細胞に導入し、Puromycin による薬剤選択を行った後にヒト心筋細胞に対してはグルコース、エンドセリン1、コルチゾールにて 3 日間刺激を行った。その後 Brefeldin A にて処理後に細胞を固定し、抗 NT-ProBNP 抗体および抗 TNNT2 抗体にて免疫染色を実施した。これらの細胞をフローサイトメトリーにて TNNT2 陽性集団より NT-ProBNP の強／弱信号分画の細胞を各々回収し、NGS を用いてライブラリーを標的としたディープシークエンスを実施した。得られた結果より MAGeCK プログラムを用いて各遺伝子における RRA スコアを算出した。計 4 回のスクリーニングを実施し、最終的な RRA スコアを算出した。

【結果】当初の計画に従い誘導性 Cas9 発現ヒト多能性幹細胞の作出に成功した。しかし、細胞集団内で Cas9 を安定して誘導することが困難であったことから、計画を変更し、分化誘導後の細胞に直接 Cas9 および gRNA を発現するベクターを導入することとし、研究を継続した。ヒト iPS 細胞から心筋細胞を誘導し、さらに幼弱心筋細胞の増殖を引き起こすことで大量の心筋細胞を作出することに成功した。これらのヒト心筋細胞を用いて行った全キナーゼを標的とした CRIPSR スクリーニングでは拡張不全型心不全の病態形成に関与が疑われる遺伝子候補の同定に成功した。ヒト心臓線維芽細胞は既存の報告に基づき誘導することは可能であったものの、長期培養により心外膜系譜様細胞への形質転換が認められたため、今後培養プロトコールの最適化が必要と考えられた。

ヒト多能性幹細胞由心筋細胞を用いた心不全発症関連遺伝子探索のための全キナーゼ CRIPSR スクリーニング



177. 多能性幹細胞を用いた拡張不全型心不全の分子機序解明

木谷　友哉

京都府立医科大学 大学院医学研究科 循環器内科学

Key words：ヒト人工多能性幹細胞，拡張不全型心不全，CRISPR/Cas9，心筋細胞，心臓線維芽細胞

緒　言

心不全に対する治療法の進歩に伴い、心不全患者の予後やQOLは大きく改善してきた。しかし、現在標準的治療薬として用いられるβ遮断薬やレニンアンジオテンシン系阻害薬は収縮不全を伴った心不全においては高い有効性を示すものの、高齢者の心不全の主体である拡張不全型心不全では有効性が乏しいことが明らかになっている。拡張不全型心不全に対する治療法の探索は国内外を問わず精力的に進められており、近年ではネプリライシン阻害薬やSGLT2阻害薬などが新たな治療薬候補として検討されているが、未だに確固たる有効性は確立していない。そのため、引き続き治療薬開発のため、治療標的となりうる分子機構の探索が必要であるものの、拡張不全型心不全の病態は未だに不明な点が多く残されている。本研究では、ヒト多能性幹細胞より心臓構成細胞を作出し、CRISPR/Cas9システムを用いた遺伝子ノックアウトスクリーニングを行い、拡張不全型心不全の病態に寄与する遺伝子の候補を探索することで、新規治療標的となりうる分子生物学的機序を明らかにすることを目的して研究を実施した。現段階ではヒト心筋細胞において全キナーゼを標的としたノックアウトスクリーニングの結果が得られており、引き続き候補遺伝子の詳細な評価を実施するとともに、他の細胞種での検討や全ゲノムスクリーニングを予定している。

方法および結果

1.　誘導性Cas9発現ヒト多能性幹細胞の作出

ヒト多能性幹細胞（SCVI-116、SCVI-273）はStanford University Cardiovascular Institute Biobank（https://med.stanford.edu/scvibiobank.html）より提供を受け、ノンフィーダー環境においてEssential 8培地にて維持培養を行った［1］。誘導性Cas9発現ドナーベクター（pAAVS1-tet-iCas9-BFP2、addgene plasmid #125519）およびAAVS1領域ゲノム編集ベクター（AAVS1 T2 CRIPR in pX330、addgene plasmid #125519）を4D-Nucleofector装置（Lonza）を用いてヒト多能性幹細胞に導入を行い、G418（100μg/ml）耐性の単一細胞由来コロニーを選択し、ゲノムDNAのAAVS1領域をPCRにて増幅することで、テトラサイクリン遺伝子発現調節システムの配列が標的の部位に導入されているクローンを同定した（図1A、B）。（プライマー配列情報、5’ Fw：GCCTGGGTCACCTCTACGG、5’ Rv：ATGATATCAGGACCGGGGTTTTCTT、3’ Fw：TATAGGCGCCCTGGTTTACATAAG、3’ Rv：CTTGGCCACGTAACCTGAGAA）引き続き配列の導入が確認できたクローンを継続培養し、ドキシサイクリン添加（Sigma、2μg/ml）48時間後に4% PFAで固定し、Triton X-100による膜透過処理後に免疫染色（一次抗体：Anti-CRISPR/Cas9、Epigentek、A-9000-010；二次抗体：Anti-mouse IgG（H＋L）、F（ab'）2 Fragment（Alexa Fluor® 555 Conjugate）、Cell signaling、4409）を実施し、BZ-X700（Keyence）にて撮像を行いCas9蛋白質の発現が誘導されることを確認した（図1C）。次に単一クローンから培養を継続した細胞集団でCas9の発現が均一に誘導されていることを確認するために、ドキシサイクリン添加後、フローサイトメトリーを用いてBFP発現レベルの評価を行った。すると各クローン内でのBFPの発現強度はさまざまであり、ドキソルビシン添加前とほぼ同等のシグナル強度の細胞分画が存在することが明らかになった（図2A）。BFPのシグナル強度が比較的弱いため実際のCas9の発現を反映できていない可能性を想定し、GFPに対する特異的gRNA GFP（標的gRNA配列：GAGCTGGACGGCGACGTAAA）を発現するGFP

恒常発現レンチウイルスベクターを LentiCRISPRv2GFP（addgene plasmid # 82416）基に作製し、選択したクローンに導入しドキシサイクリン添加による GFP シグナルの変化をフローサイトメトリーにて評価した。するとクローン間により程度はさまざまであったが、ドキシサイクリン添加後において GFP シグナル陰性細胞集団の明らかな増加は認めたものの、依然として GFP シグナル陽性細胞集団が残存していることが明らかになった（図 2B）。以上の検討から、AAVS1 領域を標的としたゲノム編集を行った単一クローン由来の細胞株であっても、長期による培養の後に Cas9 の発現を安定的に均一に誘導することができる細胞株を得ることが困難である可能性が考えられた。

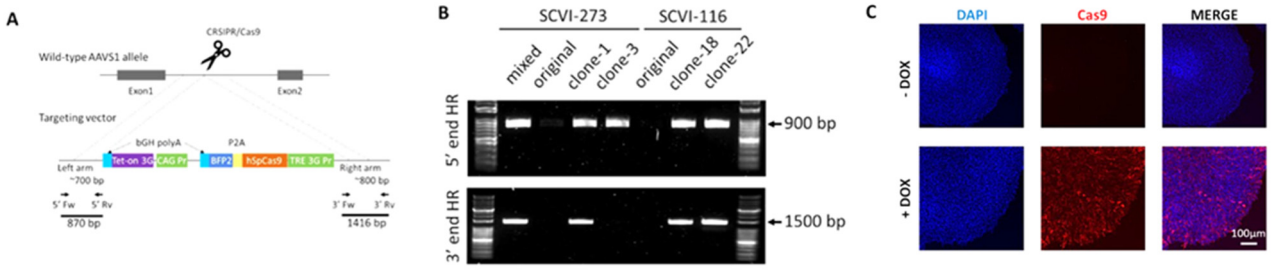


図 1. 誘導性 Cas9 発現ヒト多能性幹細胞の作出

A） CRISPR を用いた AAVS1 locus への誘導性 Cas9 導入の概略図。

B） PCR による誘導性 Cas9 配列導入の確認。SCVI-273 clone-3 では 3'末端側の導入が確認できない。

C） SCVI-116 clone-18 におけるドキシサイクリン（DOX）による Cas9 誘導。ドキシサイクリン添加群（＋DOX）、非添加群（－DOX）各々を抗 Cas9 抗体で免疫染色を行った。

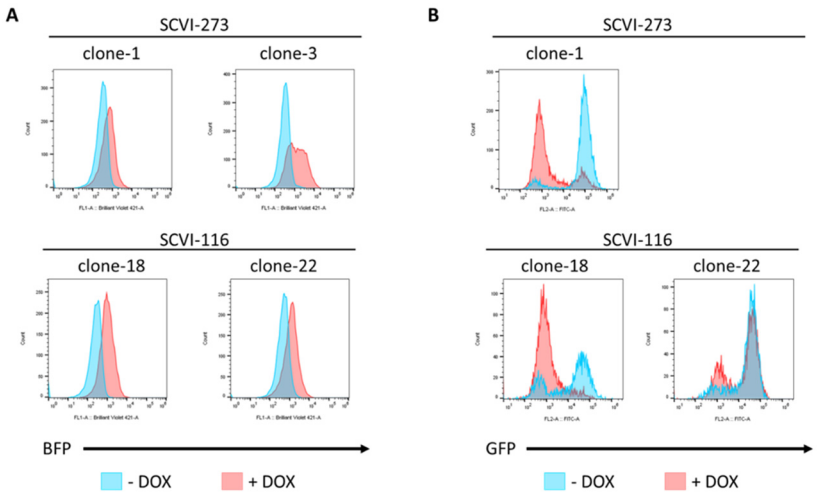


図 2. 誘導性 Cas9 発現ヒト多能性幹細胞における Cas9 誘導と遺伝子ノックアウト効率の評価

A） ドキシサイクリン（DOX）添加後 BFP シグナルの発現をフローサイトメトリーにて評価した。

B） GFP 恒常発現レンチウイルスベクターを導入後、DOX 誘導性 Cas9 の発現による GFP に対する遺伝子ノックアウト効率をフローサイトメトリーにて評価した。SCVI-273 clone-3 では 3'末端側の導入が確認できなかったこと、BFP シグナルの発現パターンが他クローンとは異なっていたことから目的としたノックインに成功していないと判断し実施していない。＋DOX：ドキシサイクリン添加群、－DOX：ドキシサイクリン非添加群。

2. ヒト多能性幹細胞由来心臓線維芽細胞を用いた CRIPSR スクリーニング

次に既報に基づき、ヒト多能性幹細胞より Wnt パスウェイ関連低分子化合物およびレチノイン酸を用いて心外膜系譜細胞を誘導し、線維芽細胞成長因子を用いて心臓線維芽細胞への誘導を行った（図 3A）[2]。光学顕微鏡による観察

では多能生幹細胞から心外膜細胞様の敷石状の形態への変化、さらに紡錘形状の線維芽細胞様への形態変化が観察された（図 3B)。次に誘導した細胞、ヒト多能生幹細胞および健常人骨髄由来間葉系幹細胞（MSC、Lonza、PT-2501）より Direct-zol RNA Kit（Zymo Research）を使用して total RNA の抽出を行った。回収した RNA より PrimeScript RT reagent Kit（Takara）を用いて逆転写を行い、CFX 384 Real-Time system（Biorad）にて KAPA SYBR FAST qPCR kit を用いて遺伝子発現の評価を行った。誘導した細胞の遺伝子発現プロファイルでは多能性マーカーである NAONG の著名な低下、および心臓線維芽細胞のマーカー（TCF21、TBX20、GATA4）の上昇が認められた（図 3C)。さらに、心臓線維芽細胞のマーカーとして報告されている DDR2（Santa Cruz、sc-81707）を評価したところほぼ全ての細胞で DDR2 陽性であることが認められた（図 3D)。以上より報告通り心臓線維芽細胞が誘導されたと判断し、下記 3 と同様に CRIPSR スクリニーニングを実施したものの、分化誘導後二週間ほど経過すると徐々に紡錘形状から敷石状細胞へ細胞形態変化が生じることが観察されたため、スクリーニング実験は保留とした。

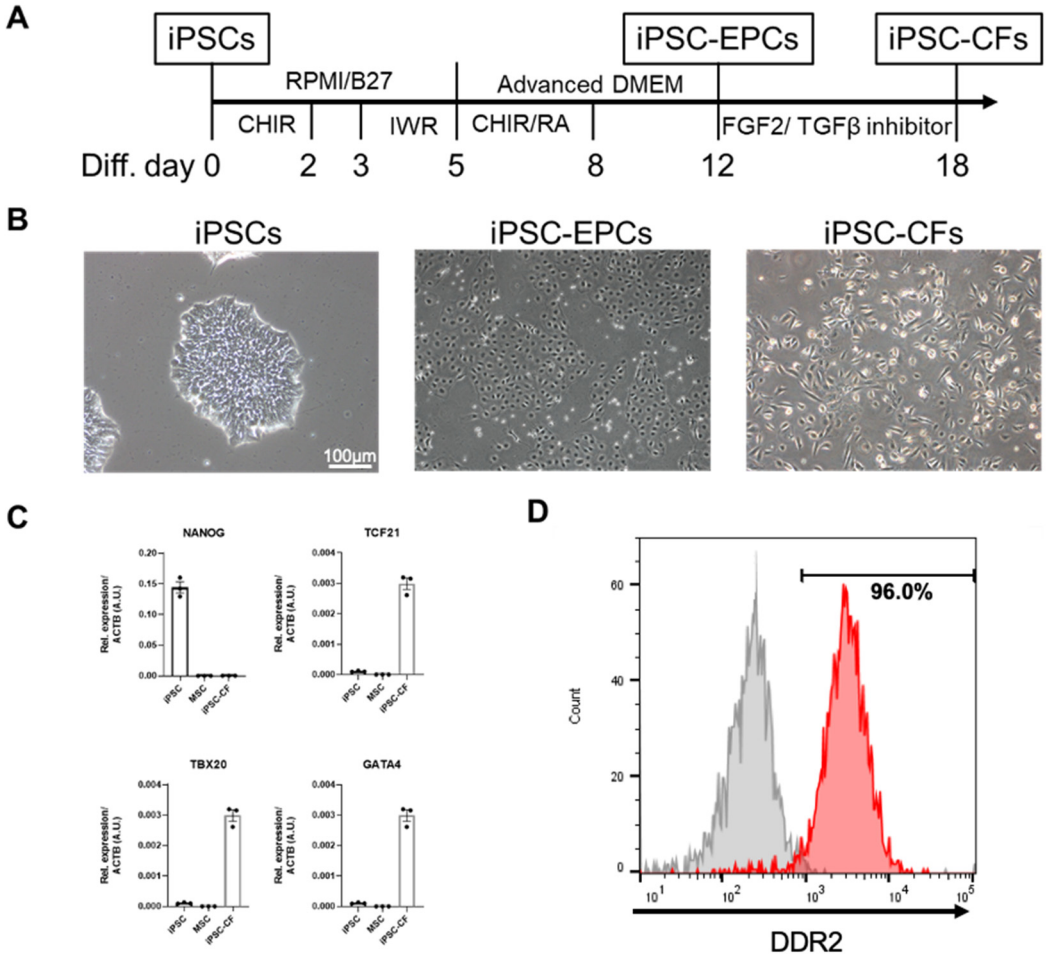


図 3. ヒト多能性幹細胞よりの心臓繊維芽細胞の誘導と評価

A) ヒト多能性幹細胞よりの心臓繊維芽細胞の誘導の概略図。

B) 分化誘導中の細胞形態の明視野像。iPSCs : iPS 細胞、iPSC-EPCs : iPS 細胞由来心外膜細胞、iPSC-CFs : iPS 細胞由来心臓線維芽細胞。

C) リアルタイム PCR による多能性幹細胞マーカー（NANOG）および心臓線維芽細胞マーカー（TCF21、TBX20、GATA4）mRNA 発現の比較。MSC : 健常人骨髄由来間葉系幹細胞。

D) iPSC-CFs における心臓線維芽細胞のマーカーDDR2 の発現評価。Gray : Isotype control、red : DDR2。

3. ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞を用いた CRIPSR スクリーニング

次にヒト多能性幹細胞から誘導した心筋細胞を増殖培養することが可能であるという近年の報告［3］に着目し検討を行った。多能性幹細胞から心筋細胞への分化誘導は低分子化合物を用いた Wnt シグナルの活性化および阻害を用いて行った［1］。多能性幹細胞から誘導したばかりの幼弱心筋を低密度下、Wnt シグナル活性化の条件で培養を行ったところ、心筋細胞の継続した増殖を確認することができた（図 4A、B）。増殖後の細胞集団をメタノールで固定後、心筋トロポニン T（abcam、ab45932、1：200）を用いてフローサイトメーターによる評価を実施し、高純度の心筋細胞が得られていることを確認した（図 4C）。引き続き、これらの心筋細胞に全キナーゼを標的とした遺伝子ノックアウト Cas9 レンチウイルスプールライブラリー（Brunello Human CRISPR Knockout Pooled Library、addgene plasmid #75314、73179）より作出したレンチウイルスベクターを MOI＝0.4 で導入し、5 日間 Puromycin による薬剤選択を行い、ウイルス導入後 14 日後に 10 mM glucose、10 nM h-endothelin-1、1 μM cortisol にて 3 日間刺激を行った。その後 Brefeldin A にて 3 時間細胞を処理後に細胞を固定し、抗 NT-proBNP 抗体（abcam、ab13115、1：500）および抗 TNNT2 抗体にて免疫染色を実施し、フローサイトメトリーにて TNNT2 陽性集団より NT-proBNP の強／弱信号分画の細胞を各々全分画の 20%を目標として回収した（図 4D）。回収した細胞より NucleoSpin® Tissue（Macherey-Nagel）を用いてゲノム DNA を回収し、既報に基づいて 3step-PCR にてライブラリーを調製した［4］。調製したライブラリーは NovaSeq6000 を用いてシークエンスされ、Cutadapt にてアダプター配列を取り除いた後、Brunello library gRNA 配列情報に基づいてアライメントを行い、MAGeCK プログラムを用いて各遺伝子における RRA スコアを算出した［5］。スクリーニングは独立して計 4 回実施し、総合的な RRA スコアを最終的に算出した（図 4E、具体的な遺伝子名の一覧は現時点では伏せさせていただく）。

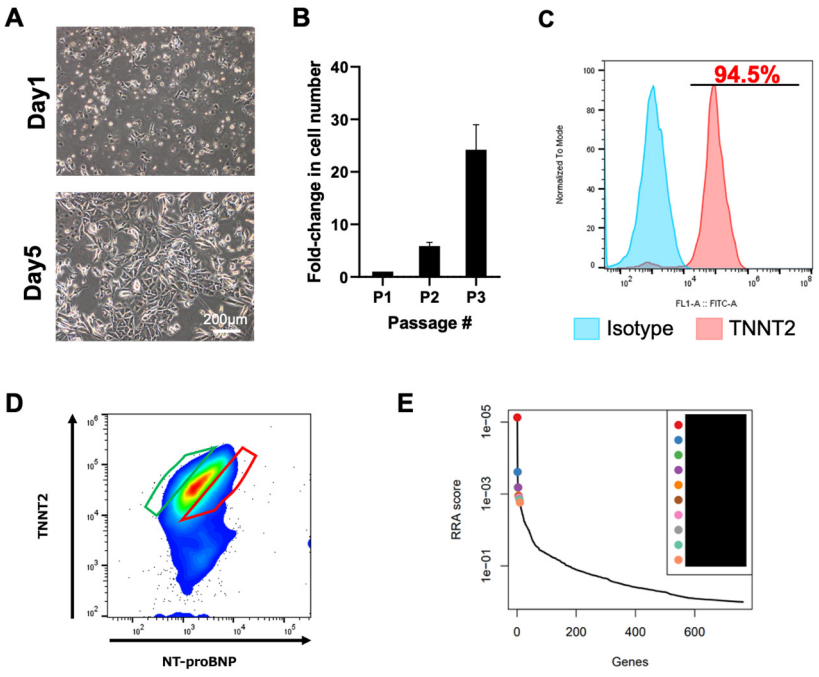


図 4. ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞を用いた CRISPR スクリーニング

A） 分化誘導終了後の幼弱心筋培養を再播種後 1 日目と 5 日目の顕微鏡写真。

B） 継代毎の心筋細胞数の変化。エラーバーは平均の標準誤差を示す（n＝3）。

C） 3 継代目（P3）の心筋細胞純度を、心筋トロポニン T（TNNT2）を用いてフローサイトメトリーにて評価した。

D） 代表的な TNNT2 および NT-ProBNP によるフローサイトメトリーによる細胞ソーティングの結果。

E） RAA スコアによる遺伝子ランキングの結果。遺伝子ノックアウトにより NT-ProBNP の発現が抑制されている遺伝子群。

考　察

本研究の立案・開始時においては誘導性 Cas9 発現ヒト多能性幹細胞をまず作出し、そこから誘導した心筋細胞を用いた CRISPR スクリーニングの実施を予定していた。しかし、検討を進めるに従い、単一クローン由来であっても Cas9 の発現が細胞集団において一定していない可能性が考えられたことから予定を変更し、分化誘導後の細胞に Cas9 発現レンチウイルスライブラリーを導入することでスクリーニングを実施した。

AAVS1 領域については、ヒト多能性幹細胞において遺伝子組み込みなどに最適な安全領域であると考えられている一方で、AAVS1 領域においても新規の DNA メチル化が未分化のヒト多能性幹細胞でもおこりうることが報告されている［6］。今回我々が実際に GFP の発現を用いて行った Cas9 の誘導による標的遺伝子ノックアウトの効率確認実験においても、GFP シグナルの残存が認められたことから GFP のノックアウトが完全には達成できてはいない可能性が示唆された。本検討ではドキシサイクリン添加 10 日後に GFP シグナルの計測を行ったことから、既に翻訳されている GFP 蛋白質がいまだ分解されずに残存していた可能性は否定できない。しかし、単一クローン由来の細胞集団であっても Cas9 の誘導効率が不均一であること、引き続き心筋細胞に分化誘導を行った後には更なるエピジェネティック変化による Cas9 の誘導効率の変化が予想されたことから、当初の計画にしたがってスクリーニング実験を実施することは困難であると判断し、計画の修正を行った。

心臓線維芽細胞は、心筋細胞とは異なり、生体より採取した後に体外で長期培養可能な細胞種ではあるものの、通常の培養条件下では自然に筋線維芽細胞様の表現系を呈すること、大量に均一な状態の線維芽細胞を取得することは困難であることから本研究では多能性幹細胞より心臓線維芽細胞を誘導し、スクリーニングに用いることとした。既報のとおり誘導した心臓線維芽細胞には心臓線維芽細胞に特徴的な形態、遺伝子発現が見られていたものの、長期培養により徐々に心外膜細胞様の形態へと変化する現象が認められた。興味深いことに最近になり我々の結果と同様に多能性幹細胞より分化した心臓線維芽細胞が心外膜細胞様の形態へと変化するため、誘導方法の改善が必要であるという報告がなされた［7］。現在この報告に基づき、より安定した心臓線維芽細胞を多能性幹細胞より誘導可能か検討を行っている。

本研究開始時点においては技術的に困難であったものの、研究期間中に多能性幹細胞から誘導したばかりの幼弱心筋を低密度下、Wnt シグナル活性化の条件で培養することで、大量の高純度な心筋細胞を得ることに成功した。これらの心筋細胞を用いて、NT-ProBNP の発現をマーカーとする全キナーゼを標的とした CRIPSR ノックアウトスクリーニングを実施した。興味深いことにこれまでに発生時より心臓特異的にノックアウトすることでマウスに心不全が発症し、その機序として AMPK や mTOR などの心筋代謝に関連する経路の異常が関わっていると報告されている遺伝子が FDR＜0.05 で逆にノックアウトすることでヒト心筋細胞において、モデル培地による NT-ProBNP の発現上昇を抑制するという結果が得られた（具体的な遺伝子名は論文投稿まで非公表とさせていただく）。我々の検討では、本遺伝子のノックアウトでは心筋細胞には明らかな障害は認めておらず、本遺伝子を標的遺伝子として引き続き、拡張不全型心不全の病態解明を目指した研究を進める計画を策定中である。さらに現在、心筋細胞を用いて引き続き全ゲノムを標的とした遺伝子スクリーニングを実施しており、拡張不全型心不全に対する新たな病態関連候補遺伝子の同定を期待している。

謝　辞

本研究に助成をいただきました上原記念生命科学財団には厚く御礼申し上げます。

文 献

1) Kitani T, Ong SG, Lam CK, Rhee JW, Zhang JZ, Oikonomopoulos A, Ma N, Tian L, Lee J, Telli ML, Witteles RM, Sharma A, Sayed N, Wu JC. Human-Induced Pluripotent Stem Cell Model of Trastuzumab-Induced Cardiac Dysfunction in Patients With Breast Cancer. Circulation. 2019 May 21;139(21):2451-2465. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.037357. PMID: 30866650; PMCID: PMC6528817.

2) Zhang H, Tian L, Shen M, Tu C, Wu H, Gu M, Paik DT, Wu JC. Generation of Quiescent Cardiac Fibroblasts From Human Induced Pluripotent Stem Cells for In Vitro Modeling of Cardiac Fibrosis. Circ Res. 2019 Aug 16;125(5):552-566. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315491. Epub 2019 Jul 10. PMID: 31288631; PMCID: PMC6768436.

3) Buikema JW, Lee S, Goodyer WR, Maas RG, Chirikian O, Li G, Miao Y, Paige SL, Lee D, Wu H, Paik DT, Rhee S, Tian L, Galdos FX, Puluca N, Beyersdorf B, Hu J, Beck A, Venkamatran S, Swami S, Wijnker P, Schuldt M, Dorsch LM, van Mil A, Red-Horse K, Wu JY, Geisen C, Hesse M, Serpooshan V, Jovinge S, Fleischmann BK, Doevendans PA, van der Velden J, Garcia KC, Wu JC, Sluijter JPG, Wu SM. Wnt Activation and Reduced Cell-Cell Contact Synergistically Induce Massive Expansion of Functional Human iPSC-Derived Cardiomyocytes. Cell Stem Cell. 2020 Jul 2;27(1):50-63.e5. doi: 10.1016/j.stem.2020.06.001. PMID: 32619518; PMCID: PMC7334437.

4) Hoshino A, Wang WJ, Wada S, McDermott-Roe C, Evans CS, Gosis B, Morley MP, Rathi KS, Li J, Li K, Yang S, McManus MJ, Bowman C, Potluri P, Levin M, Damrauer S, Wallace DC, Holzbaur ELF, Arany Z. The ADP/ATP translocase drives mitophagy independent of nucleotide exchange. Nature. 2019 Nov;575(7782):375-379. doi: 10.1038/s41586-019-1667-4. Epub 2019 Oct 16. PMID: 31618756; PMCID: PMC6858570.

5) Li W, Xu H, Xiao T, Cong L, Love MI, Zhang F, Irizarry RA, Liu JS, Brown M, Liu XS. MAGeCK enables robust identification of essential genes from genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screens. Genome Biol. 2014;15(12):554. doi: 10.1186/s13059-014-0554-4. PMID: 25476604; PMCID: PMC4290824.

6) Ordovás L, Boon R, Pistoni M, Chen Y, Wolfs E, Guo W, Sambathkumar R, Bobis-Wozowicz S, Helsen N, Vanhove J, Berckmans P, Cai Q, Vanuytsel K, Eggermont K, Vanslembrouck V, Schmidt BZ, Raitano S, Van Den Bosch L, Nahmias Y, Cathomen T, Struys T, Verfaillie CM. Efficient Recombinase-Mediated Cassette Exchange in hPSCs to Study the Hepatocyte Lineage Reveals AAVS1 Locus-Mediated Transgene Inhibition. Stem Cell Reports. 2015 Nov 10;5(5):918-931. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.09.004. Epub 2015 Oct 8. Erratum in: Stem Cell Reports. 2018 Feb 13;10 (2):673. PMID: 26455413; PMCID: PMC4649136.

7) Whitehead AJ, Hocker JD, Ren B, Engler AJ. Improved epicardial cardiac fibroblast generation from iPSCs. J Mol Cell Cardiol. 2022 Mar;164:58-68. doi: 10.1016/j.yjmcc.2021.11.011. Epub 2021 Nov 24. PMID: 34826415.