

33. Hogan B, Beddington R, Constantini F, Lacy E. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Cold Spring, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1994.
34. Gilbertson-Beadling S, Powers EA, Stamp-Cole M, et al. The tetracycline analogs minocycline and doxycycline inhibit angiogenesis in vitro by a non-metalloproteinase-dependent mechanism. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1995;36(5):418-424.
35. Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell*. 1998;93(5):741-753.
36. Adams RH, Wilkinson GA, Weiss C, et al. Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev*. 1999;13(3):295-306.
37. You LR, Lin FJ, Lee CT, DeMayo FJ, Tsai MJ, Tsai SY. Suppression of Notch signalling by the COUP-TFII transcription factor regulates vein identity. *Nature*. 2005;435(7038):98-104.
38. Miyashita K, Itoh H, Sawada N, et al. Adrenomedullin promotes proliferation and migration of cultured endothelial cells. *Hypertens Res*. 2003;26:S93-S98.
39. Birukova AA, Zagranichnaya T, Fu P, et al. Prostaglandins PGE(2) and PGI(2) promote endothelial barrier enhancement via PKA- and Epac1/Rap1-dependent Rac activation. *Exp Cell Res*. 2007;313(11):2504-2520.
40. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, et al. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation*. 2000;102(11):1296-1301.
41. Rossi F, Bertone C, Petricca S, Santiemma V. Ghrelin inhibits angiotensin II-induced migration of human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2007;192(2):291-297.
42. Yang J, Matsukawa N, Rakugi H, et al. Upregulation of cAMP is a new functional signal pathway of Klotho in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;301(2):424-429.
43. Csiszar A, Labinskyy N, Smith KE, et al. Downregulation of bone morphogenetic protein 4 expression in coronary arterial endothelial cells: role of shear stress and the cAMP/protein kinase A pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(4):776-782.
44. Yamamoto K, Sokabe T, Watabe T, et al. Fluid shear stress induces differentiation of Flk-1-positive embryonic stem cells into vascular endothelial cells in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(4):H1915-H1924.
45. Urbich C, Stein M, Reisinger K, Kaufmann R, Dimmeler S, Gille J. Fluid shear stress-induced transcriptional activation of the vascular endothelial growth factor receptor-2 gene requires Sp1-dependent DNA binding. *FEBS Lett*. 2003;535(1-3):87-93.
46. Sakurai Y, Ohgimoto K, Kataoka Y, Yoshida N, Shibuya M. Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(4):1076-81.
47. Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J*. 2001;20(11):2768-2778.
48. Imai T, Suzuki M, Sakano H. Odorant receptor-derived cAMP signals direct axonal targeting. *Science*. 2006;314(5799):657-661.
49. Vogt Weisenhorn DM, Roback LJ, Kwon JH, Wainer BH. Coupling of cAMP/PKA and MAPK signaling in neuronal cells is dependent on developmental stage. *Exp Neurol*. 2001;169(1):44-55.
50. Kim G, Choe Y, Park J, Cho S, Kim K. Activation of protein kinase A induces neuronal differentiation of HiB5 hippocampal progenitor cells. *Brain Res Mol Brain Res*. 2002;109(1-2):134-145.
51. Shiga H, Asou H, Ito E. Advancement of differentiation of oligodendrocyte progenitor cells by a cascade including protein kinase A and cyclic AMP-response element binding protein. *Neurosci Res*. 2005;53(4):436-441.
52. Carmeliet P, Tessier-Lavigne M. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature*. 2005;436(7048):193-200.
53. Cimato T, Beers J, Ding S, et al. Neuropilin-1 identifies endothelial precursors in human and murine embryonic stem cells before CD34 expression. *Circulation*. 2009;119(16):2170-2178.

The cardiac pacemaker-specific channel *Hcn4* is a direct transcriptional target of MEF2

Shinobu Kuratomi¹, Yoko Ohmori¹, Masayuki Ito¹, Kuniko Shimazaki¹, Shin-ichi Muramatsu², Hiroaki Mizukami³, Hideki Uosaki⁴, Jun K. Yamashita⁴, Yuji Arai⁵, Koichiro Kuwahara⁶, and Makoto Takano^{1*}

¹Department of Physiology, School of Medicine, Jichi Medical University, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan; ²Division of Neurology, Department of Medicine, School of Medicine, Jichi Medical University, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan; ³Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan; ⁴Laboratory of Stem Cell Differentiation, Stem Cell Research Center, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan; ⁵Department of Bioscience, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka 565-8565, Japan; and ⁶Department of Medicine and Clinical Sciences, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

Received 21 January 2009; revised 8 May 2009; accepted 22 May 2009; online publish-ahead-of-print 28 May 2009

Time for primary review: 34 days

KEYWORDS

Hcn4;
MEF2;
Sino-atrial node;
Channel;
Transcription

Aims *Hcn4*, which encodes the hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-sensitive channel (I_h), is a well-established marker of the cardiac sino-atrial node. We aimed to identify *cis*-elements in the genomic locus of the *Hcn4* gene that regulate the transcription of *Hcn4*.

Methods and results We screened evolutionarily conserved non-coding sequences (CNSs) that are often involved in the regulation of gene expression. The VISTA Enhancer Browser identified 16 regions, termed CNS 1–16, within the *Hcn4* locus. Using the luciferase reporter assay in primary neonatal rat cardiomyocytes, we found that CNS13 conferred a prominent enhancer activity (more than 30-fold) on the *Hcn4* promoter. Subsequent mutation analysis revealed that the *Hcn4* enhancer function was dependent on myocyte enhancer factor-2 (MEF2) and activator protein-1 (AP1) binding sequences located in CNS13. Electrophoretic mobility shift assay and chromatin immunoprecipitation confirmed that MEF2 and AP1 proteins bound CNS13. Furthermore, overexpression of a dominant negative MEF2 mutant inhibited the enhancer activity of CNS13, decreased *Hcn4* mRNA expression and also decreased the amplitude of I_h current in myocytes isolated from the inflow tract of embryonic heart.

Conclusion These results suggest that the novel enhancer CNS13 and MEF2 may play a critical role in the transcription of *Hcn4* in the heart.

1. Introduction

The appropriate timing of cardiac muscle contraction is regulated by the electrical conduction system of the heart and consists of cardiomyocytes possessing specialized electrical function. The precise expression pattern of cardiac ion channel genes in relation to such electrophysiological properties has been extensively studied.^{1,2} Previous reports have demonstrated that the hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-sensitive cation current (I_h) encoded by the *Hcn4* gene appears one of the ion currents underlying pacemaker depolarization.^{3,4} In mammalian adult heart, *Hcn4* is specifically expressed in the sino-atrial node (SAN). During development *Hcn4* is also expressed in

the foetal and neonatal chamber myocardium. As a result of this distribution, *Hcn4* is now recognized as a key marker gene of the SAN.^{5,6} Despite its role as an SAN marker, little is known about the *cis*-elements that directly regulate *Hcn4* expression. Progress in the genome project and comparative genomic-base approaches have proven useful in the identification of gene regulatory sequences in a wide range of genomic loci.^{7,8} We have previously reported that an 847 bp proximal sequence induces minimal promoter activity of the *Hcn4* gene.⁹ In addition to this proximal upstream region, we also identified conserved, non-coding sequences within the *Hcn4* gene locus and analysed their enhancer function. We found that the novel enhancer contained binding sites for activator protein-1 (AP1) and myocyte enhancer factor-2 (MEF2) and played a critical role in the expression of *Hcn4*. These results outline the potential mechanisms underlying SAN differentiation.

* Corresponding author. Tel: +81 285 58 7308; Fax: +81 285 40 6294.
E-mail address: takanom@jichi.ac.jp

2. Methods

2.1 Construction of the promoter reporter plasmid

Luciferase reporter constructs were prepared using pGL4.10 vector (Promega) and the *Hcn4* promoter construct was obtained as previously described.⁹ Conserved non-coding sequence (CNS) fragments were isolated from mouse genomic DNA by PCR with the primer pairs listed in Supplementary material online, Table S1 and were subcloned into the upstream region of the *Hcn4* promoter.

2.2 Cell culture

For the culture of neonatal cardiomyocytes, 1- to 2-day-old rats were decapitated, the ventricle rapidly dissected and myocytes isolated by collagenase digestion (Worthington, type 2, 80 U/mL). The myocytes were then enriched by discontinuous Percoll gradient centrifugation (yield more than 90%).

For the culture of embryonic cardiomyocytes, rat embryos (13 days after fertilization) were removed from pregnant rats under deep anaesthesia with ether, the inflow tract of embryonic heart dissected and the primordial right and left appendices removed. Myocytes were then isolated using the same procedure as that for the culture of neonatal myocytes.

Embryonic and neonatal cardiomyocytes were plated at a density of 2×10^4 and 10^5 cells/well, respectively, in 24-well plates and cultured in DMEM with 10% foetal bovine serum.⁹

All experiments were approved in advance by the animal Ethics Committee of Jichi Medical University. The investigation conforms with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

2.3 Luciferase reporter gene assay

Luciferase reporter constructs (0.5 µg) and pGL4.74 vector (0.03 µg) were co-transfected into neonatal cardiomyocytes using Lipofectamine LTX (Invitrogen). Luciferase activities were measured 3 days after the transfection using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). Transcriptional activities were obtained from three separate assays performed in quadruplicate.

2.4 Electrophoretic mobility shift assays

The myc-tagged mouse c-Jun/AP1 and MEF2C proteins were *in vitro* translated using TNT Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) and CNS13 DNA probes radiolabelled with [³²P]. The binding reaction was then performed in a reaction buffer (final volume=20 µL) containing 20 mM HEPES (pH 7.6), 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.1% Nonidet P-40, 5% glycerol, 5 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, and 1 µg poly(dI-dC). The probe (10 fmol) incubated with 1 µL of protein was analysed on 4% polyacrylamide gels in $\times 0.25$ TBE buffer. In competition experiments, 100-fold molar excess of double-strand oligonucleotides (AP1: 5'-ATT CTG AGT CAG AGA-3' and MEF2: 5'-AGG TGG GTT AAA AAT AGA GCC CT-3') were added.

2.5 Chromatin immunoprecipitation

Chromatin isolated from neonatal rat cardiomyocytes was immunoprecipitated with specific antibodies directed against anti-c-Jun/AP1 (Calbiochem) and anti-MEF2 (AnaSpec) using the EZ chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay kit (Upstate) and analysed by PCR using the following primer pairs: CNS13 ChIP primers 5'-CCT TGG TTG TGA GTC TGT GTC T-3' (forward) and 5'-AGT GGA GAG ACT GCT CTT TTC C-3' (reverse) and control ChIP primers 5'-AAT GGG ACT CCT CTT ACT CAT TTC T-3' (forward) and 5'-AAA GTC CCT GAT GAC ACA CTA GTT C-3' (reverse).

2.6 AAV vector production and transfection

Adeno-associated virus (AAV) vector plasmids contain an expression cassette consisting of a CMV promoter followed by the first intron of human growth hormone, target cDNA, woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element (GenBank accession no. J04514) and the SV40 poly-A signal sequence, between the inverted terminal repeats of the AAV-3 genome. The plasmids pAAV-dnMEF2 and pAAV-GFP contained the cDNA of the dominant negative MEF2 (dnMEF2) fused with Orange fluorescent protein (Clontech) and GFP, respectively. The two helper plasmids, pHelper (Agilent) and pAAV1-RC, harbour the *E2A*, *E4*, and *VA RNA* genes of the adenovirus genome, and the AAV-1 *rep* and *cap* genes, respectively. HEK293 cells were cotransfected using the calcium phosphate coprecipitation method with the vector plasmid, pAAV1-RC and pHelper. AAV1 vectors were harvested and purified via two sequential continuous iodixale ultracentrifugations. The vector titer was determined by quantitative PCR (Q-PCR) of DNase I-treated vector stocks, yielding 10^{11} - 10^{12} vector genome copies (vg).¹² 2×10^4 foetal myocytes were transfected with 10^{10} vg AAV1-dnMEF2 or AAV1-EGFP; and 10^5 vg Empty AV5 vector was also transfected as a helper.

2.7 RT-PCR and Q-PCR analysis

Three days after the transfection of AAV1, total RNA was isolated from primary cultured embryonic myocytes using TRIZOL reagent (Invitrogen). Single-strand cDNA was synthesized using Superscript III (Invitrogen). Q-PCR was carried out with predesigned Taqman Probes for *hcn4*, *hcn2*, *hcn1*, *stars*, and the 18s rRNA, in an ABI Prism 7700 System (Applied Biosystems).

2.8 Immunostaining of cardiomyocytes

Cardiomyocytes were fixed with 4% paraformaldehyde and incubated with primary antibodies directed against HCN4 (1:200 dilution; Chemicon) and actinin (1:750; Monoclonal, Sigma). Following extensive washes, cells were incubated with Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit or anti-mouse Ig secondary antibodies at a concentration of 1:500 (Molecular Probes).

2.9 Electrophysiological analysis

Electrophysiological measurements were carried out using an Axopatch200B amplifier and a Digidata 1320 interface (Axon). The bathing solution contained 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.33 mM NaH₂PO₄, 0.5 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 0.5 mM BaCl₂, 5 mM HEPES (pH 7.4 with NaOH), and the standard high K⁺ pipette solution contained 110 Aspartic acid, 30 mM KCl, 5 mM MgATP, 5 mM Na₂ creatine phosphate, 0.1 mM Na₂GTP, 2 mM EGTA, 10 mM HEPES (pH 7.2 with KOH).

2.10 Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SD values. Statistical analysis was performed using the Student's *t*-test and $P < 0.05$ was defined as statistically significant.

3. Results

3.1 Functional analysis of conserved non-coding regions within the *Hcn4* gene locus

Our previous study revealed that the proximal 847 bp sequence in the *Hcn4* upstream region is essential for promoter activity.⁹ In order to locate additional *cis*-regulatory sequences, we extensively searched the CNSs in the genomic locus of *Hcn4*. As illustrated in Figure 1A, we identified 16 regions using VISTA Enhancer Browser, and designated these regions CNS 1-16 (Supplementary material online, Table S1).⁸

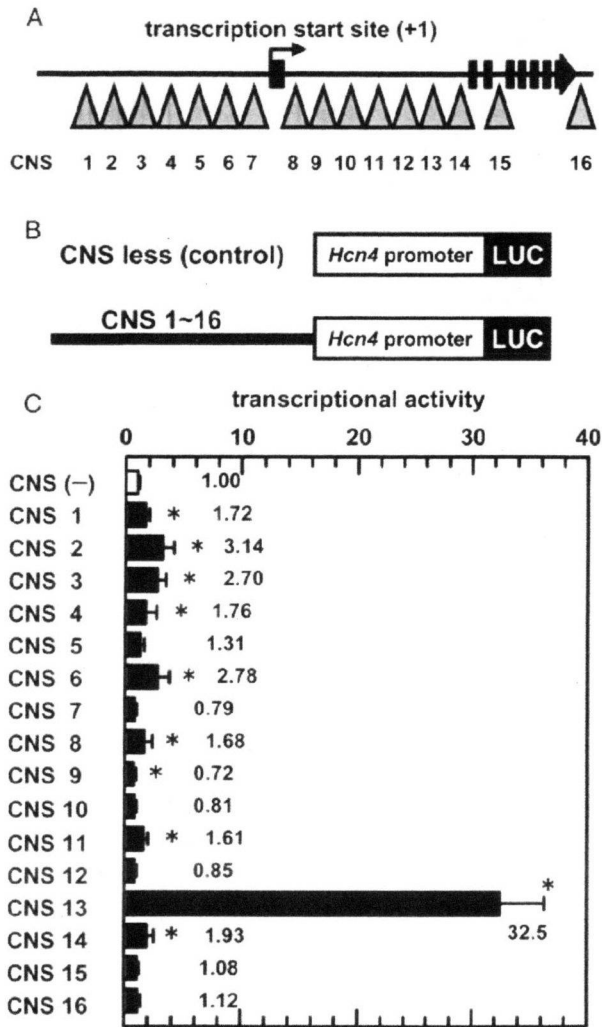


Figure 1 Enhancer activity of the CNS fragments. (A) A schematic diagram outlining the genomic organization of the murine *Hcn4* gene. Arrows indicate CNS regions. (B) Structure of the luciferase reporter constructs. The *Hcn4* promoter comprises nucleotides -446 to +400 relative to the transcription start site. (C) Enhancer activity conferred by the CNS fragments. Data are presented as relative values to the activity of the *Hcn4* promoter. * $P < 0.05$ compared with construct of *Hcn4* promoter alone.

We next evaluated enhancer activity for each of the CNS regions using the luciferase reporter assay. In order to achieve this, we linked CNS fragments to the *Hcn4* promoter expressing the luciferase reporter gene in the pGL4.10 vector (Figure 1B) and analysed enhancer function in cultured primary cardiomyocytes. As shown in Figure 1C, nine CNS fragments (CNS1, 2, 3, 4, 6, 8, 11, 13, and 14) significantly enhanced *Hcn4* promoter activity. The CNS13 construct led to an ~33-fold increase in transcriptional activity, in comparison to the remainder of the constructs that resulted in no more than a 3.2-fold increase.

3.2 MEF2 and AP1 sites are required for the enhancer activity of CNS13

To confirm that CNS13 acts as an authentic enhancer, we next constructed inverted CNS13 and tandem repeated CNS13 fragments and fused with the *Hcn4* promoter. As

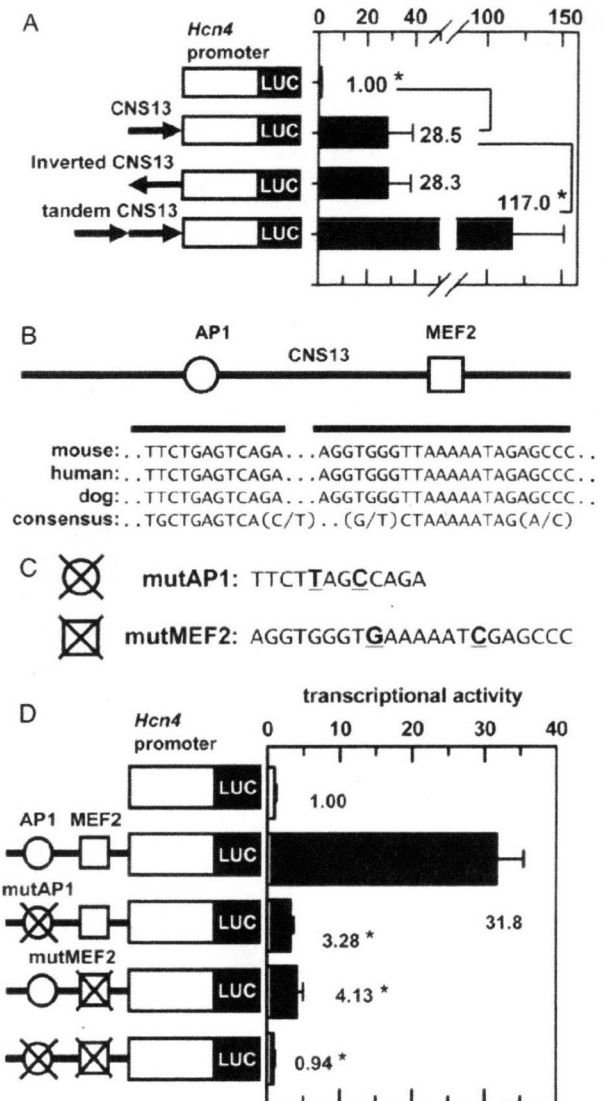


Figure 2 MEF2 and AP1 sites are essential in CNS13. (A) A schematic diagram of control, inverted, and tandem CNS13 constructs. The inverted construct was made by swapping the restriction sites at the ends of the control CNS13 fragment. The tandem construct, by introducing *EcoRI* site between the fragments. * $P < 0.05$ compared with control CNS13 construct. (B) A schematic diagram of the putative binding sequences for AP1 (open circle) and MEF2 (open square) in CNS13. The AP1 and MEF2 sequences in mouse, human, and dog are aligned with the consensus sequences. The score for the matches were AP1: core match 1.000; matrix match 0.923. MEF2: core match 1.000; matrix match 0.957. (C) Mutation of the AP1 and MEF2 sites. The bold, underlined characters indicate the substituted nucleotides. (D) Enhancer activity of the CNS13 mutants. Data is presented as relative values to the activity of the *Hcn4* promoter. * $P < 0.05$ compared with *Hcn4* promoter.

shown in Figure 2A, no significant difference was found between the enhancer activities of normal- and inverted-CNS13 fragments. Tandem repeat CNS13 robustly activated the *Hcn4* promoter. We then focused our study on the CNS13 sequence and explored its *cis*-regulatory mechanism and its potential as a novel enhancer for the *Hcn4* promoter.

To characterize functional motifs in the CNS13 sequence, we searched putative transcription factor binding sites using

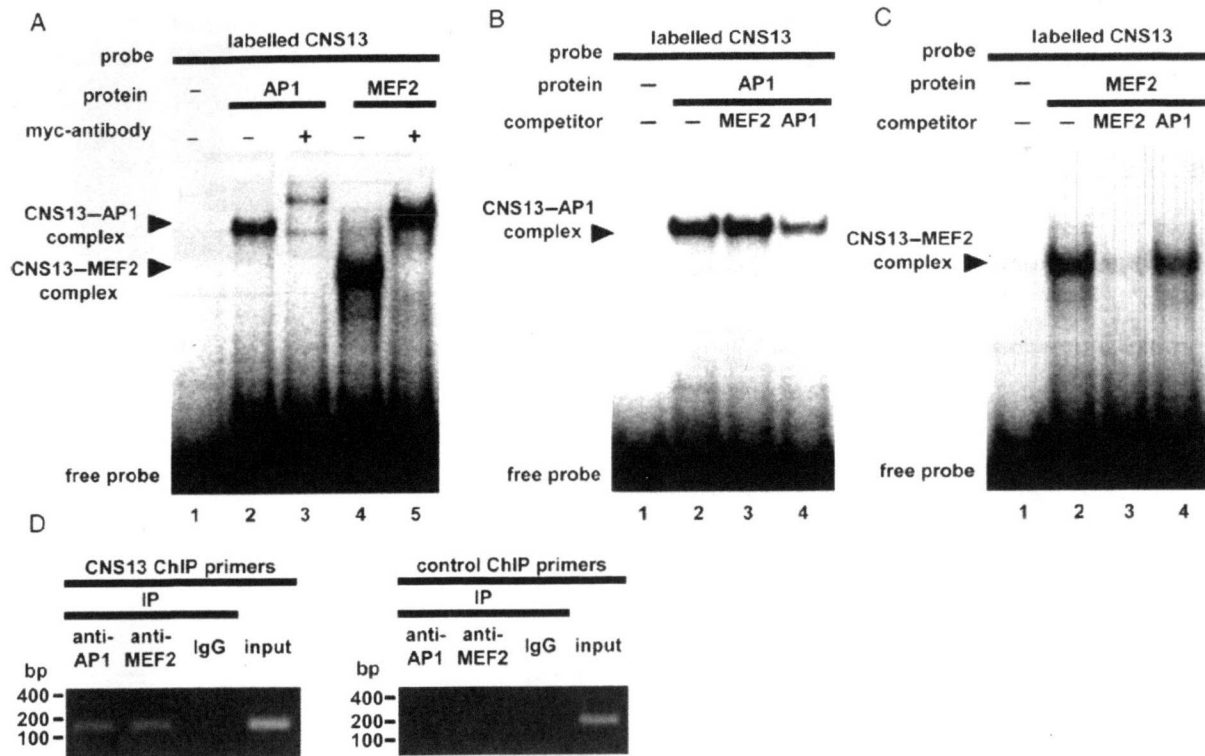


Figure 3 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay using a radiolabelled CNS13 probe. (A) EMSA with myc-tagged AP1 and MEF2 proteins. The myc-antibody was used for the supershift assay. (B) Competitive EMSAs for the CNS13-AP1 complex. (C) CNS13-MEF2 complexes. (D) ChIP products using specific antibodies directed against AP1 and MEF2, or a pre-immune IgG were analysed by PCR. Input lane represents PCR products amplified from sonicated chromatin prior to immunoprecipitation. The 152 bp (left) and 200 bp (right) products correspond to CNS13 and distinct genomic regions, respectively.

the TRANSFAC database and detected MEF2- and AP1-binding motifs. As shown in *Figure 2B*, the putative MEF2- and AP1-binding sequences are perfectly conserved among several mammalian species and closely resemble their consensus sequences. These motifs, however, were not conserved in non-mammalian species. We prepared CNS13 reporter constructs harbouring mutations within the MEF2 and AP1 sites (*Figure 2C*) and examined whether enhancer activity was mediated by these sites. As shown in *Figure 2D*, a single mutation in either MEF2- or AP1-binding sequences significantly reduced transcriptional activity, whereas double mutations completely abolished CNS13-induced enhancement. These findings indicate that the *cis*-enhancer function of the CNS13 fragment is dependent on these binding sequences.

We then examined binding of MEF2 and AP1 protein to CNS13. As demonstrated by the electrophoretic mobility shift assay (EMSA) outlined in *Figure 3A*, a slow-migrating band was visualized as a result of interaction between the CNS13 probe and the myc-tagged AP1 protein (lane 2). Another complex was also formed when myc-tagged MEF2 protein was co-incubated with the CNS13 probe (lane 4). Myc-antibody also formed additional complexes (lanes 3 and 5). To precisely identify the DNA sequences recognized by MEF2 and AP1 proteins, we performed competitive EMSA using unlabelled competitors composed of partial CNS13 sequences. As shown in *Figure 3B*, the signal for the CNS13-AP1 complex was attenuated by the addition of AP1 competitor (lane 4), but not MEF2 competitor (lane 3),

indicating that the complex formation is AP1-sequence specific. In CNS13-MEF2 complex competition assays, the opposite patterns were observed (*Figure 3C*). In addition, we amplified a genomic DNA fragment of CNS13 using ChIP with antibodies directed against AP1 and MEF2 (*Figure 3D*). These findings strongly suggest that MEF2 and AP1 transcription factors bind to CNS13 and play an important physiological role in *Hcn4* transcription.

3.3 dnMEF2 resulted in reduced Hcn4 expression

Among the MEF2 family of transcription factors, *MEF2A*, *C*, and *D* are expressed in cardiomyocytes.¹⁰ Given that AP1 is a ubiquitously expressed transcription factor, we focused our study on the physiological role of MEF2. It has previously been shown that MEF2 proteins form hetero- and homodimers and that overexpression of dnMEF2 inhibit its transcriptional activity.¹¹ The schematic in *Figure 4A* outlines the structure of dnMEF2. In the current study, we demonstrate that dnMEF2 significantly reduced the transcriptional activity of the luciferase reporter vectors and that the enhancer activity of CNS13 was attenuated to 12% of the control levels. When MEF2 binding motif of CNS13 was disrupted, the overexpression of dnMEF2 did not significantly inhibit the enhancer activity (*Figure 4B*).

In order to examine the physiological role of MEF2 *in vivo*, we next expressed dnMEF2 using the AAV1 vector in cardiomyocytes isolated from the inflow tract of the embryonic rat heart, a site in which the HCN4 channel is highly

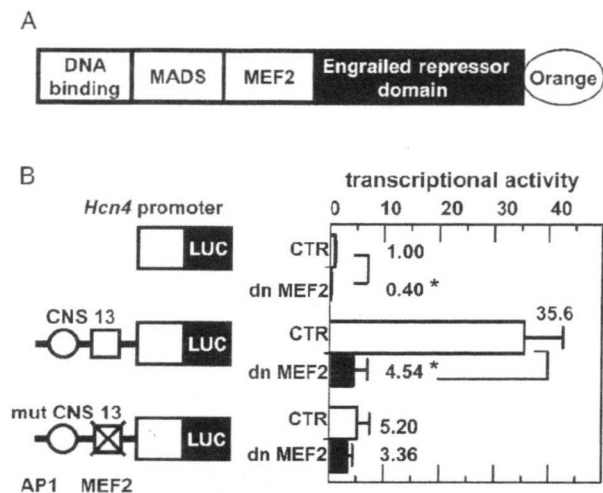


Figure 4 dnMEF2 inhibits *Hcn4* enhancer activity. (A) A schematic of the structure of dominant negative MEF2 mutant originated from MEF2C. (B) Transcriptional activity of the *Hcn4* promoter and CNS13, but not MEF2 site mutated CNS13, are significantly suppressed by dnMEF2. Along with luciferase reporter constructs, pAAV-dnMEF2 (0.3 μ g) or pAAV-GFP (control; 0.3 μ g) plasmids were cotransfected. Data are presented as relative values to the activity of the *Hcn4* promoter ($n = 4$; * $P < 0.05$).

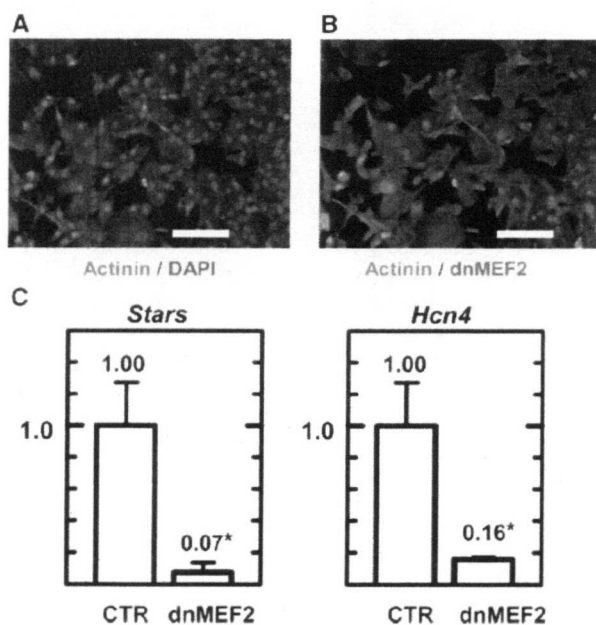


Figure 5 AAV1-dnMEF2 resulted in a reduction in *Stars* and *Hcn4* mRNA levels. (A) Immunofluorescent staining of cardiomyocytes for actinin (green). Nucleus is counter stained with DAPI (blue). Approximately 99% of the cells are actinin positive. Bar, 100 μ m. (B) AAV1-dnMEF2 transfected myocytes demonstrate a nuclear orange fluorescent signal. Approximately 70% of the cells are transfected. (C) Relative mRNA levels measured by Q-PCR. Left, *Stars*. Right, *Hcn4*. ($n = 4$; * $P < 0.05$ vs. control).

expressed.¹² As shown in *Figure 5A*, ~70% of cardiomyocytes was successfully transfected with dnMEF2. Three days following the transfection, *Hcn4* expression levels of *Hcn4* were evaluated using real-time PCR. We also evaluated the expression levels of striated muscle activator of Rho signalling (*Stars*), which is known as a direct transcriptional target of MEF2.¹³ As shown in *Figure 5A* and *B*, we found

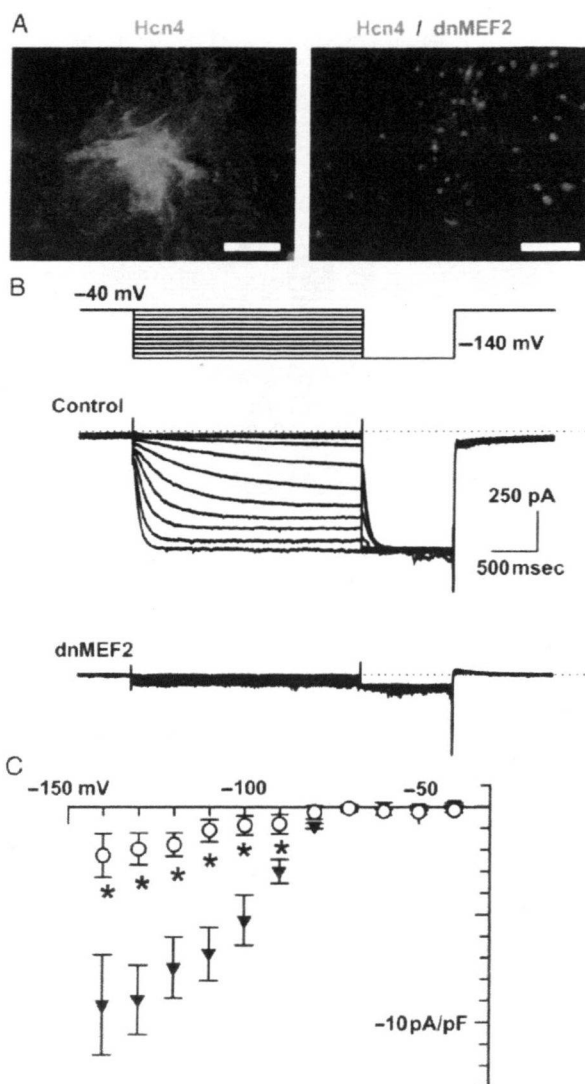


Figure 6 AAV1-dnMEF2 suppressed functional expression of the HCN4 channel. (A) Immunostaining for HCN4 (green). Left, control. Right, AAV1-dnMEF2. Bar, 100 μ m. (B) I_h recorded in embryonic myocytes. The pulse protocol is shown in the top panel. The dotted line indicates the zero current level. (C) Current-voltage diagram of I_h . The amplitude of time-dependent current elicited by hyperpolarization was normalized by cellular capacitance. Filled triangle, control; open circle, dnMEF2 ($n = 7$; * $P < 0.05$).

that both *Stars* and *Hcn4* mRNA levels were significantly reduced in dnMEF2-transfected myocytes, when compared with GFP-transfected myocytes as the negative control. In dnMEF2-transfected myocytes, however, the mRNA levels of HCN1 and HCN2, other types of HCN channels expressed in the heart, were not changed significantly (Supplementary material online, *Figure S1*). These channels might be regulated by different transcriptional mechanisms.¹⁴

We finally examined the functional expression of the HCN4 channel in embryonic myocytes transfected with dnMEF2. As shown in *Figure 6A* (left panel), HCN4 protein was clearly identified in control myocytes. However, only faint staining of HCN4 protein was observed in the myocytes transfected with dnMEF2 (nuclear-localized orange signals). In accordance with this, robust I_h current was also recorded in the control myocytes (*Figure 6B*, upper traces), whereas I_h

current was significantly reduced in dnMEF2-transfected myocytes (Figure 6B, lower traces). Figure 6C outlines the current-voltage diagram. The amplitude of I_h in dnMEF2-transfected myocytes was ~18% of the control myocytes. Similar results were also obtained for ES-derived cardiomyocytes (data not shown).¹⁵

4. Discussion

The transcription factors AP1 and MEF2 are known to play a variety of roles in the development of the heart. It has been reported that the ablation of *c-jun*, who along with *c-fos* forms the AP1 transcription factor, gave rise to the anomalies of right ventricular outflow tract and a reduction in *Cx43* expression.¹⁶ Although we did not examine the direct physiological role of AP1 in the present study, it appears reasonable to expect that the expression of the *Hcn4* gene might also be reduced following the deletion of the AP1 protein. During development, *MEF2C* is known to be the predominant form of *MEF2* expressed in the embryonic heart. *MEF2A* and *MEF2D* became the major *MEF2* forms after birth.¹⁰ Gene knockout of *MEF2C* results in an embryonic lethal phenotype.¹⁷ *MEF2D*^{-/-} mice are viable, demonstrating a weak response to hypertrophic stimulation.¹⁸ *MEF2A* knockout mice generated on a 129Sv background die immediately following birth and demonstrate sinus arrhythmia and conduction block.¹⁹ As the present study demonstrates that the expression of *Hcn4* is dependent on MEF2, it would be interesting to explore the ion channel expression in SAN of *MEF2A*^{-/-} animals.

Recent studies have suggested that the *Nkx2-5* and *Pitx2c* transcription factors repress the expression of *Hcn4* in chamber myocardium, a result that is likely due to the inhibition of activators.¹⁶ However, activators of *Hcn4* have not been identified in cardiomyocytes to date. The results of the current study suggest that MEF2 and AP1 may be candidate activators. The transcription factor *Tbx3*, in addition to *Hcn4*, is also specifically expressed in SAN. Ectopic expression of *Tbx3* in the atrium is known to induce *Hcn4* expression. However, it remains unclear whether *Hcn4* is a direct target of *Tbx3*.⁵ Interestingly, we identified conserved MEF2- and AP1-like sequences within the *tbx3* gene locus. The spatiotemporal expression of *Tbx3* and *Hcn4* might be regulated via similar mechanisms.

MEF2 expression in the heart has been shown to be increased in the atrium.²⁰ Therefore, regional differences in *MEF2* expression might account in part for the spatial distribution of *Hcn4*. In this respect, it appears to be particularly important to investigate whether CNS13 is able to reproduce the spatiotemporal expression pattern of *Hcn4* in the heart. Although we have generated transgenic mice harbouring a *LacZ* reporter gene driven by the CNS13 and *Hcn4* promoter, we were unable to obtain consistent patterns of β -gal expression in embryos (data not shown). Thus, it is speculated that a combination of multiple CNSs may be required to reproduce the precise spatiotemporal expression pattern of *Hcn4*. Future studies will be required to address this question.

Supplementary material

Supplementary Material is available at *Cardiovascular Research* online.

Acknowledgements

We thank Dr M.A. Arnold for providing the dominant negative MEF2 cDNA.

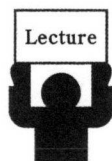
Conflict of interest: none declared.

Funding

This work was supported in part by a Grant from the Vehicle Racing Commemorative Foundation and a Grant-in-Aid for Scientific Research from JSPS (#20300141).

References

- Shram G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S. Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res* 2002;**90**:939-950.
- Marionneau C, Couette B, Liu J, Mangoni M-E, Nargoet J, Lei M *et al*. Specific pattern of ion channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J Physiol* 2005;**562**:223-234.
- Ishii TM, Takano M, Xie L-H, Noma A, Ohmori H. Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J Biol Chem* 1999;**274**:12835-12839.
- Hermann S, Stieber J, Ludwig A. Pathophysiology of HCN channels. *Pfugers Arch* 2007;**454**:517-522.
- Hoogaars W-M, Engel A, Brons J-F, Verkerk A-O, de Lange F-J, Wong L-Y *et al*. *Tbx3* controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria. *Genes Dev* 2007;**21**:1098-1112.
- Mommersteeg M-T, Hoogaars W-M, Prall O-W, de Gier-de Vries C, Wiese C, Clout D-E *et al*. Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. *Circ Res* 2007;**100**:354-362.
- Pennacchio L-A, Ahituv N, Moses A-M, Prabhakar S, Nobrega M-A, Shoukry M *et al*. *In vivo* enhancer analysis of human conserved non-coding sequences. *Nature* 2006;**444**:499-502.
- Visel A, Minovitsky S, Dubchak I, Pennacchio L-A. VISTA Enhancer Browser—a database of tissue-specific human enhancers. *Nucleic Acids Res* 2007;**35**:D88-D92.
- Kuratomi S, Kuratomi A, Kuwahara K, Ishii TM, Nakao K, Saito Y *et al*. NRSF regulates the developmental and hypertrophic changes of HCN4 transcription in rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;**353**:67-73.
- Potthoff M-J, Olson E-N. MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development* 2007;**134**:4131-4140.
- Arnold M-A, Kim Y, Czubryt M-P, Phan D, McAnally J, Qi X *et al*. MEF2C transcription factor controls chondrocyte hypertrophy and bone development. *Dev Cell* 2007;**12**:377-389.
- Li X-G, Okada T, Kodera M, Nara Y, Takino N, Muramatsu C *et al*. Viral-mediated temporally controlled dopamine production in a rat model of Parkinson disease. *Mol Ther* 2006;**13**:160-166.
- Kuwahara K, Teg Pipes G-C, McAnally J, Richardson J-A, Hill J-A, Bassel-Duby R *et al*. Modulation of adverse cardiac remodeling by STARS, a mediator of MEF2 signaling and SRF activity. *J Clin Invest* 2007;**117**:1324-1334.
- Pachucki J, Burmeister LA, Larsen PR. Thyroid hormone regulates hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel (HCN2) mRNA in the rat heart. *Circ Res* 1999;**85**:498-503.
- Yanagi K, Takano M, Narazaki G, Uosaki H, Hoshino T, Ishii T *et al*. HCN and Cav3 channels confer automaticity of embryonic stem-derived cardiomyocytes. *Stem Cells* 2007;**25**:2712-2719.
- Jochum W, Passegue E, Wagner EF. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene* 2001;**20**:2401-2412.
- Lin Q, Schwarz J, Bucana C, Olson E-N. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science* 1997;**276**:1404-1407.
- Kim Y, Phan D, vanRooy E, Wang D-Z, McAnally J, Qi X *et al*. The MEF2D transcription factor mediates stress-dependent cardiac remodeling in mice. *J Clin Invest* 2008;**118**:124-132.
- Naya F-J, Black B-L, Wu H, Bassel-Duby R, Richardson J-A, Hill J-A *et al*. Mitochondrial deficiency and cardiac sudden death in mice lacking MEF2A transcription factor. *Nat Med* 2002;**11**:1303-1309.
- Zhao X-S, Gallardo T-D, Lin L, Schageman J-J, Shohet R-V. Transcriptional mapping and genomic analysis of the cardiac atria and ventricles. *Physiol Genomics* 2002;**12**:53-60.



解説

iPS細胞研究の現状と展望*

山下 潤**

Key Words : embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells, regeneration, differentiation

はじめに：iPS細胞登場の背景と意義

ES細胞(胚性幹細胞; embryonic stem cells)はマウスやヒトの早期胚(胚盤胞; blastocyst)の段階において、将来胎仔を形成する内細胞塊(inner cell mass)と呼ばれる部位を取り出して樹立した細胞株であり、体中すべての種類の細胞に分化することのできるいわゆる万能の幹細胞と考えられている。マウスES細胞の樹立は1981年であり、マウスES細胞から拍動心筋細胞が誘導されることが1985年には報告されているが、ES細胞の医学・生物学における大きな貢献は、再生医学ではなくノックアウトマウスなどのさまざまな遺伝子改変マウスの樹立を可能にしたことであった。実際、マウスES細胞を樹立したマーティン・エバンス博士は、2007年のノーベル医学生理学賞をノックアウトマウスの開発を行った研究者らと共同受賞している。1990年代後半から、神経幹細胞の発見など成体の中に存在する体性幹細胞/組織幹細胞に関する研究とともに、ES細胞を含めた幹細胞の再生医学応用に関する研究が急速に盛んになってきた。1998年末のヒトES細胞樹立により、幹細胞の再生医療応用はさらに現実味を帯びて語られるようになってきた。しかし、ヒトES細胞においては、①技術・安全面の問題、特に未分化ES細胞があやまって移植

されると奇形腫を形成する可能性がある、ということに加えて、②倫理面の問題、すなわち、i)ヒトES細胞の樹立の際にヒト受精卵を壊す必要がある、ii)免疫による拒絶を受けないES細胞を樹立するためにヒト体細胞クローン胚(成体細胞の核を除核した未受精卵に核移植したクローン胚)を作る必要が考えられる、ということが実際の応用への大きな障壁になっていた。こうした状況を背景に生まれてきた新しい幹細胞がiPS細胞(人工多能性幹細胞; induced pluripotent stem cells)である。

iPS細胞は線維芽細胞など分化した細胞に特定の遺伝子群(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-mycなど)を導入することにより、ES細胞様の万能の幹細胞の性質を持たせることに成功した細胞であり、形態、遺伝子発現パターンに加えて、*in vitro*での分化能力や、iPS細胞をもとに最終的にiPS細胞由来のマウス個体を作製できることなど、ES細胞としての大きな特性を満たしている。最初のiPS細胞は2006年に京都大学の山中らによって報告された¹⁾。2007年には山中らおよびトムソンら²⁾³⁾、その後さらに多くのほかのグループによりヒトiPS細胞の樹立が報告された。ヒトiPS細胞はヒトES細胞において認められた倫理的問題、上記の②-i), ii)を一気に回避できる画期的発明であり、「iPS細胞を用いてすぐにも再生医療が実現でき

* iPS cell research—hope and hype—.

** Jun K. YAMASHITA, M.D., Ph.D.: 京都大学再生医科学研究所幹細胞分化制御研究領域/京都大学物質—細胞統合システム拠点iPS細胞研究センター〔〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町53〕; Laboratory of Stem Cell Differentiation, Stem Cell Research Center, Institute for Frontier Medical Sciences/Center for iPS cell Research and Application (CiRA), Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University, Kyoto 606-8507, JAPAN

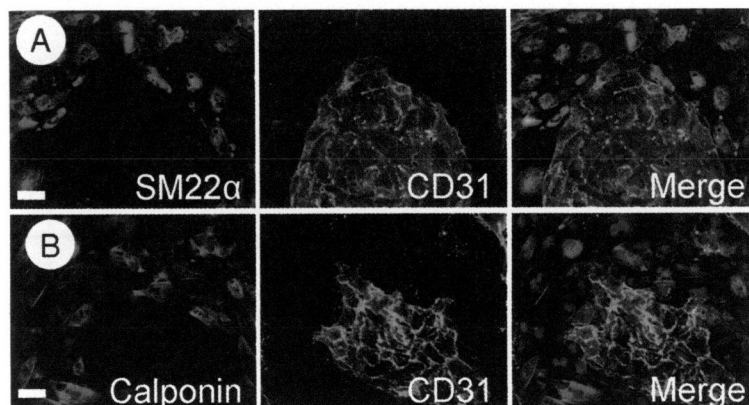


図1 マウスiPS細胞からの血管内皮・壁細胞分化
 マウスiPS細胞由来Flk1陽性細胞をVEGFおよび血清存在下で培養することにより、CD31陽性内皮細胞(緑)とSM22α(A)またはカルボニン(B)陽性壁細胞(赤)が選択的に誘導される。(文献⁶⁾より改変)

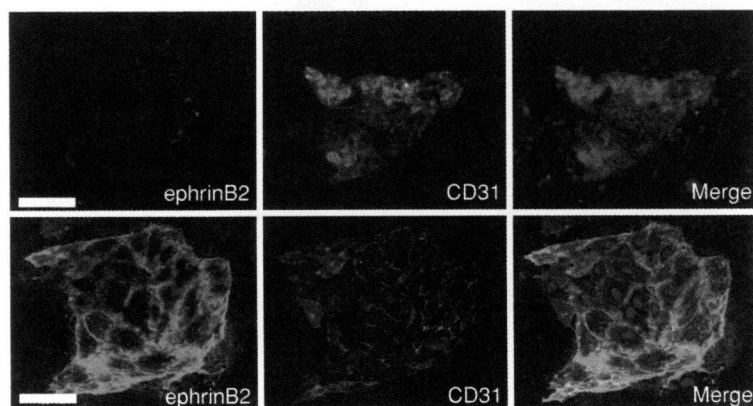


図2 マウスiPS細胞からの動静脈内皮細胞分化
 Flk1陽性細胞をVEGFおよび血清存在下で培養した場合、その大部分がCD31陽性/ephrinB2陰性の静脈内皮細胞となる(上段)。VEGFに加え8bromo-cAMPを投与しcAMPシグナルを活性化すると、CD31陽性/ephrinB2陽性動脈内皮細胞が出現する(下段)。(文献⁸⁾より改変)

るのではないか」というような、ある種の熱狂を生み出した。しかし、iPS細胞には依然として上記①の奇形腫の問題は存在しているし、iPS細胞特有の「遺伝子導入による細胞変異・がん化の問題」など、新たな問題もあり、今後地道に解決すべき課題は多い。これらiPS細胞を巡る可能性と問題点について、循環器領域との関連を中心に述べることにする。

マウスiPS細胞の心血管細胞分化

筆者らはこれまで、マウスおよびヒトES細胞を用いて心血管細胞の分化再生研究を行ってき

た。すなわち、マウス未分化ES細胞から、VEGF(血管内皮増殖因子; vascular endothelial growth factor)の受容体の一つであり、血管内皮・血球の前駆細胞や中胚葉細胞のマーカでもあるFlk1(2型VEGF受容体; VEGF receptor-2)を発現する細胞を誘導し、Flk1陽性細胞を共通の前駆細胞として、血管内皮細胞、血管壁細胞、血球細胞、心筋細胞といった循環器系細胞を系統的に分化誘導することに成功している⁴⁾⁵⁾。この新しい分化誘導システムを用いて、ES細胞由来の心筋前駆細胞の同定⁵⁾や動静脈リンパ管内皮細胞をそれぞれES細胞から誘導すること⁶⁾⁷⁾にも成功し

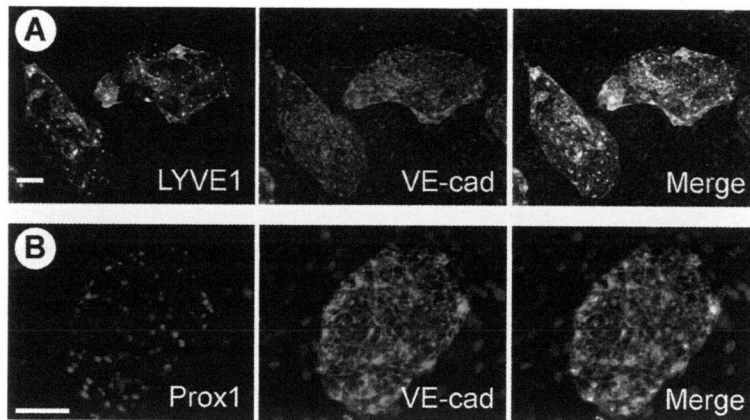


図3 マウスiPS細胞からのリンパ管内皮細胞分化
Flk1陽性細胞をOP9ストローマ細胞上で培養することにより、LYVE1陽性(A)またはProx1陽性(B)かつVE-カドヘリン陽性のリンパ管が誘導される。
(文献⁸⁾より改変)

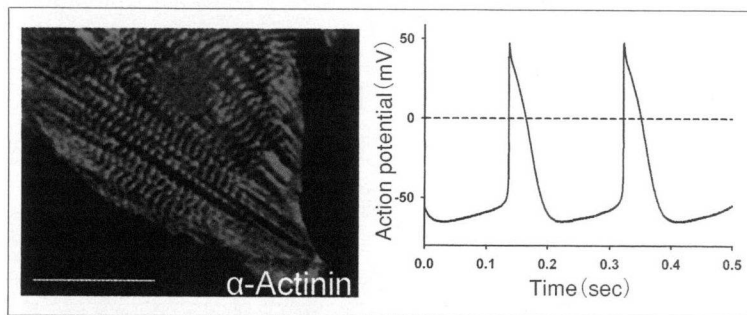


図4 マウスiPS細胞からの心筋細胞分化
Flk1陽性細胞をOP9ストローマ細胞上で培養することにより拍動心筋細胞が出現する。拍動細胞はsarcomere構造を示し(左:赤;アクチニン染色),ペースメーカー細胞様の活動電位を示す(右)。
(文献⁸⁾より改変)

ている。ヒトES細胞からの血管細胞の誘導や虚血モデルへの移植実験などにも関与している(京都大学内分泌代謝内科との共同研究)。このマウスES細胞の系統的心血管細胞分化システムをマウスiPS細胞に導入し、筆者らはいち早くiPS細胞からのこれら心血管細胞の分化誘導に成功した⁸⁾。すなわち、未分化マウスiPS細胞をLIF(leukemia inhibitory factor)非存在下に培養することによりFlk1陽性細胞が誘導された。Flk1陽性細胞をVEGFおよび血清存在下に培養することにより、主に静脈を中心とする内皮細胞および壁細胞が(図1)、VEGFに加えてcAMPシグナルを刺激することにより動脈内皮細胞が(図2)、OP9ストローマ細胞上で培養することにより血球、リンパ管内皮細胞(図3)、心筋細胞が(図4)、それぞれ誘導さ

れた。マウスiPS細胞からのFlk1陽性細胞、(動静脈リンパ管)内皮細胞、壁細胞の分化様式、分化効率などはほとんどマウスES細胞と変わりがなかった。このように、マウスES細胞とマウスiPS細胞はほぼ完全に同等な心血管分化能と分化動態を示し、マウスES細胞と同様に系統的に心血管細胞を分化誘導することが可能であった(図5)。また、iPS細胞由来細胞の担がんヌードマウスへの細胞移植実験により、iPS細胞由来血管細胞が内皮および壁細胞として生体内血管新生に寄与していることも確認している(図6)(未発表)。ただし、マウスiPS細胞を樹立する際に外来性に導入された遺伝子群の発現が長期分化培養中に再上昇したようにみえる例が観察された。明らかにがん化したような細胞や未分化になった細胞

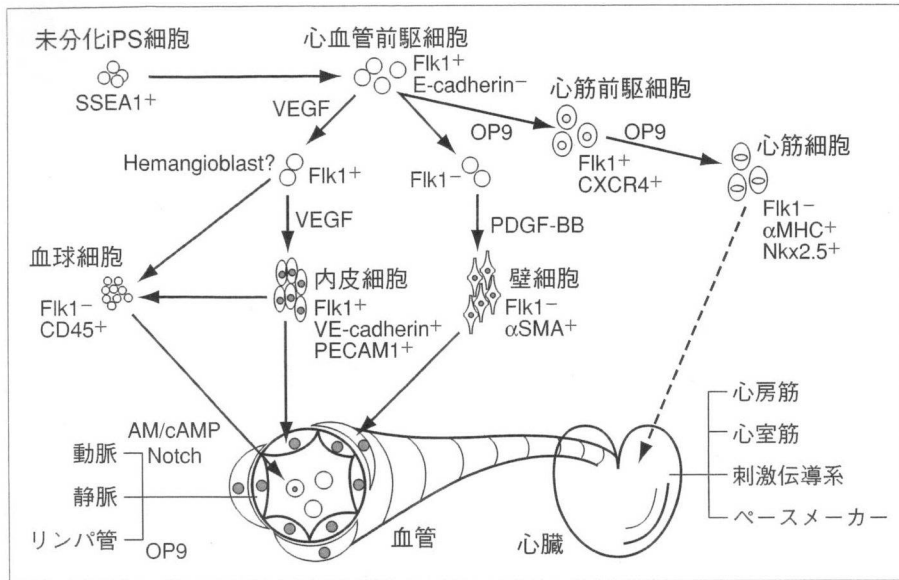


図5 マウスiPS細胞からの系統的心血管細胞分化

マウスiPS細胞から誘導したFlk1陽性細胞を共通の前駆細胞として、心血管系の構成細胞である血管内皮、壁細胞、心筋細胞、さらには動脈静脈リンパ管内皮細胞や種々の心筋細胞を系統的に分化誘導することができる。(文献¹⁰⁾より改変)

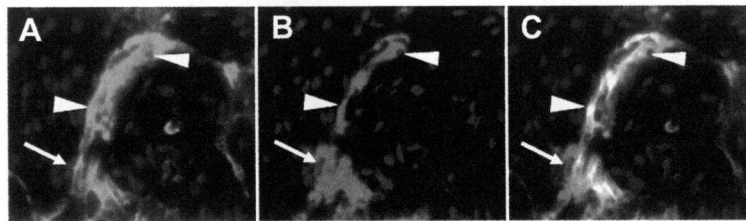


図6 マウスiPS細胞由来血管細胞による生体内血管新生

ヌードマウスの腫瘍周囲に移植されたマウスiPS細胞由来血管細胞は成体内再生に寄与する。A：CD31陽性内皮細胞(緑)。B：iPS細胞由来細胞(赤)。C：合成画像。核(青)。iPS細胞由来CD31陽性内皮細胞(矢頭)およびそれに隣接してiPS細胞由来CD31陰性壁細胞(矢印)が認められる。

が出現することはなかったが、ES細胞とは異なりiPS細胞独特の問題である導入遺伝子の影響については慎重に対応する必要があると考えられた。ほかにマウスiPS細胞からの心血管細胞分化に関しては、心筋細胞を誘導したとの報告⁹⁾および筆者らに類似した分化システムを用いた心血管細胞分化の報告¹⁰⁾と血管平滑筋分化の報告¹¹⁾などがある。

ヒトiPS細胞の心血管細胞分化

筆者らはヒトiPS細胞の心血管細胞分化にも取り組んでいる。ヒトES細胞の維持培養条件に準

じた環境で誘導・樹立されたヒトiPS細胞は、その維持および分化誘導においてもヒトES細胞に類似した動態を示した。筆者らは、ヒトES細胞において報告されている心筋分化誘導法¹²⁾に準じて培養することにより、自己拍動する心筋細胞コロニーの誘導にすでに成功している。心筋に特徴的なsarcomereの形成や自己拍動に同調したCa²⁺の取り込みなど、形態的機能的特性も確認している(未発表)。また、胚様体(embryoid body)法を用いてヒトiPS細胞から心筋を誘導した報告が2009年2月に最初になされ¹³⁾、その後日本からも胚様体法を用いて薬剤に反応する心筋細胞

を誘導したことが報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾。血管に関しては、京都大学のグループがヒトES細胞と同様の2段階分化誘導法を用いて、ヒトiPS細胞から血管内皮細胞および壁細胞を誘導することに成功している¹⁶⁾。

マウスES細胞とマウスiPS細胞、ヒトES細胞とヒトiPS細胞はそれぞれ維持培養法、分化誘導法などにおいてほとんど同等の特性を有していると考えられる。今後のiPS細胞研究においては、マウスおよびヒトES細胞研究がその土台となり、また常に比較対象のスタンダードとなると考えられる。iPS細胞の出現によって、ES細胞研究は衰退するどころかさらにその重要性を増していると考えられる。

iPS細胞研究の臨床への貢献

ES細胞、iPS細胞研究の循環器領域における意義はやはり心血管再生治療への応用が中心的に期待されると考えられるが、それ以外にも患者特異的モデル細胞の構築という新しいアプローチができることにより、病態解明や創薬治療応用など、さまざまな形での臨床面への貢献が可能である。

1. 誘導細胞の細胞移植応用

ヒトiPS細胞は、ヒトES細胞に存在した倫理面の問題、および患者特異的iPS細胞を樹立できることにより移植免疫の問題も回避できるため、細胞移植による再生医療応用が期待されている。循環器領域においても、心筋再生による心筋梗塞や心筋症その他の心不全治療、血管再生による虚血性疾患の治療、生物学的ペースメーカーによる洞不全症候群の治療などが細胞治療ターゲットとして想定される。しかし、ヒトiPS細胞を用いたこれら細胞治療の実現に至るまでには数多くの乗り越えるべきハードルが残っている。

(1) 効率的な心血管分化誘導法および純化法の開発

ヒトの心筋梗塞においては10⁹個オーダーに至る心筋細胞が死ぬともいわれている。そのレベルの細胞数を用意することが可能な効率的誘導法を開発する必要がある。現在までで最も効率がよいと考えられるヒトES細胞からの心筋分化誘導法において、ヒトES細胞1個から心筋細胞3個と報告されている¹⁷⁾。また、ヒトiPS細胞は

ヒトES細胞と同様に奇形腫を形成するので、未分化ヒトiPS細胞を厳密に除去できる細胞純化法が必要である。

(2) 移植用細胞の開発

最終的にヒトに対して細胞を移植するためには、単に細胞を誘導して純化するというだけでは不十分で、GMP基準の医薬品と同様な品質管理のもとに移植用細胞を用意できるようにする必要がある。もともとなるiPS細胞から血清やフィーダー細胞なしで一貫して培養して、分化誘導・純化が行えるようにする必要があり、(1)から(2)の間には実は大きな隔りがある。

(3) 細胞移植法の開発

(1)、(2)を経て用意された細胞をヒトに移植する際に、いかなる細胞群をどのような方法をもって移植すれば、有効かつ安全であるかを評価していく必要がある。前臨床段階ではサルなどの大型動物を含めたスタディで評価する必要がある。最近、iPS細胞を未分化のまま20万個をマウス心筋梗塞モデルに移植すると、奇形腫の出現は認めずに心筋、血管に分化して心機能が回復したという報告がなされている¹⁸⁾。一方、マウスiPS細胞由来神経細胞移植の実験では、0.05%以下の未分化細胞の混入(100個以下/合計)でも奇形腫を形成したとの報告もある¹⁹⁾。モデルや臓器の違いがあるとはいえ、こうした大きな落差を持った報告がなされることは、細胞移植法の評価の大きな問題点である。

(4) ヒトにおける評価

(1)～(3)を経てようやくヒトへの応用が可能となると考えられる。実験的医療としての患者への細胞移植例や有効例などは比較的早く数年単位で報告されるかもしれない。しかし、1つの細胞治療法が安全性と有効性の確認を経て一般的に使用される治療法として確立されるまでには、通常薬剤と同等以上の多大な労力と時間を要する可能性がある。

2. 患者特異的モデル細胞

患者自身から細胞を採取し患者特異的なiPS細胞を樹立できるというiPS細胞にしかない特性は、移植免疫を回避した細胞治療ということだけでなく、まったく新しい形で病態の解明や創薬への応用が可能である²⁰⁾²¹⁾。

(1) 病態解明

心筋症, QT延長症候群, 洞不全症候群など, 心臓を構成する細胞そのものに起因すると考えられる疾患が中心となると思われるが, 患者自身の細胞からiPS細胞を樹立し, そこから該当する細胞を分化誘導し種々のモデル細胞を構築できることは, 病態解明にまったく新しい手段を提供する. すなわち, これまでごく少量の生検サンプルの解析に限局されていたものが, 個々の症例から生きた細胞を潤沢に得られることにより, 標的細胞の遺伝子解析, 機能解析や薬剤の効果判定などを, 実際の症例に関して繰り返し行うことが可能となる. 原因遺伝子不明の症例においてもモデル細胞が構築できるので, モデル細胞を用いた原因遺伝子探索も可能となる. このように, 病態解明に向けたアプローチの方法は飛躍的に増大すると考えられる.

(2) 創薬応用

iPS細胞の創薬応用には大きく, 新規薬剤の探索と薬剤安全性試験への応用の2つが考えられる. 疾患モデル細胞を用いて, 同細胞の異常を改善する新規薬剤や疾患特異的に作用する薬剤などの探索が可能となる. また, 培養下における分化モデルを用いることにより, 心筋分化促進物質などの新たな生理活性物質の探索も可能となる. 筆者らは, マウスiPS細胞を用いて3次元培養下における血管構造形成モデルを構築し, 新規海洋生物由来HDAC(ヒストン脱アセチル化酵素)阻害物質azumamideの血管形成抑制作用を示すことに成功した²²⁾. 同モデルを用いた血管形成抑制または促進物質の探索が可能と考えられる. さらに, こうしたシステムを患者特異的iPS細胞を用いて構築することにより, 疾患特異的作用物質の探索などにも展開可能と考えられる.

受精卵を用意することが必要であるヒトES細胞と比べて, iPS細胞は数多くの細胞株を樹立しやすくiPS細胞バンクが構築しやすい. そこから細胞を誘導してarray(アレイ)化することにより, 種々のヒトモデル細胞パネルのようなものを構築することができる. こうしたヒトモデル細胞パネルは薬剤の安全性試験に応用可能と考えられる. たとえば, 千人分や万人分などの心筋細胞や肝細胞を並べたパネルを用いて薬剤の細

胞毒性をスクリーニングすることにより, 稀に発生する心毒性や肝障害などを事前に検出できるかもしれない. さらには, 障害を起こす細胞を解析し原因を明らかにすることにより, 副作用を起こす症例を事前に特定し投薬を避ける「テーラーメイド医療」に貢献しうる可能性もある.

3. その他動物モデルへの応用

循環器病関係のモデル動物には, マウスモデルばかりでなくマウス以外の動物種のものも多くある(高血圧自然発症ラット, 糖尿病モデルラット, 心筋症ハムスターなど). これらモデル動物からのiPS細胞の樹立が可能となれば, モデル動物と同動物由来細胞を用いて, 動物モデルと細胞実験を相互対応させながら新しい病態の解析を行うことなどが可能となると考えられる.

iPS細胞研究の今後

iPS細胞に関する研究は今後, iPS化(初期化)機構に関するもの, iPS細胞そのものを利用したもの, iPS化という現象を利用したものなど, 多岐にわたって進められると思われる.

1. iPS細胞の改良

iPS細胞は当初, 3~4個の遺伝子をレトロウイルスを用いて導入することにより誘導されているが, 細胞治療に用いることができるレベルのiPS細胞を樹立するためには誘導法, 誘導効率などの改良が必要である.

(1) c-mycトランスジーンなしiPS細胞

iPS細胞誘導に用いた4因子の1つであるc-mycはがん遺伝子の一つであり, 実際, mycありiPS細胞由来のマウス個体では効率ががんが発生した. その後, mycを除いた3因子でもiPS細胞誘導が可能となったが, mycなしiPS細胞由来マウス個体ではがんの発生がほとんど認められなくなった²³⁾.

(2) レトロウイルスなしiPS細胞

現在, iPS細胞誘導にはレトロウイルスによる遺伝子導入が行われている. レトロウイルスにより導入された遺伝子はゲノム上のどこかに組み込まれることになるので, 導入遺伝子が組み込まれた場所によってはがん化を含む種々の細胞の変異をもたらす可能性がある. レトロウイルスを用いずゲノムをintactに保ったままの遺伝

子導入の方がより安全なiPS細胞を樹立できると考えられる。2008年に、アデノウイルスベクターを用いた一過性遺伝子発現によるiPS細胞誘導が報告された²⁴⁾。

(3) ウイルスベクターなしiPS細胞

上記アデノウイルスによる報告のわずか1週間後、ウイルスベクターを用いずプラスミドのみによるiPS細胞誘導法が山中らにより同じくサイエンス誌に報告されている²⁵⁾。さらにその後、トランスポゾンを用いた方法²⁶⁾やEBウイルスをベースにしたベクター²⁷⁾を用いて導入遺伝子がゲノムに残らない方法によるヒトiPS細胞の誘導も報告された。このように、iPS細胞が報告されてからわずか3年足らずであるが、iPS細胞の改良は急速に進んでいる。

(4) トランスジーンなしiPS細胞

ウイルスを用いない場合でも、遺伝子操作をした細胞のヒトへの移植応用は慎重に行われるべきと考えられている。遺伝子操作を行わず、タンパクを作用させたり²⁸⁾、低分子化合物²⁹⁾を用いてiPS細胞を誘導しようとする試みが盛んに行われている。しかし、たとえば低分子化合物の多くは癌性を有していることは古くから知られている。誘導に成功しても誘導された細胞のiPS細胞としての機能および安全性は厳密に評価される必要がある。

(5) 誘導効率の改善

患者特異的iPS細胞バンクの構築など、将来的には多数の安定したiPS細胞株を樹立できることが必要となる。そのために、現在数%以下であるiPS細胞誘導効率をあげて、さまざまなヒトや組織からiPS細胞を樹立可能にしておく必要がある。最近、がん抑制遺伝子p53がiPS細胞誘導に関与しており、p53の機能を抑制することによりiPS細胞誘導効率を20倍以上増加させたことが報告された³⁰⁾。同様の報告が5報同時にNatureに掲載され、この領域の競争の激しさが象徴的に示された。

(6) 培養方法の改善

ヒトへの細胞移植応用に用いるiPS細胞の場合には、血清やフィーダー細胞を用いずに樹立し、GMP基準を満たすレベルのiPS細胞を用意する必要がある。

2. iPS化(リプログラミング)機構の解析

3個または4個の特定の遺伝子を導入することにより、線維芽細胞などからiPS細胞が誘導されるという事実は明らかとなったが、その分子メカニズムはまったく不明である。遺伝子を導入された細胞のうち、iPS細胞化するのはいったいどの細胞で、iPS細胞化される細胞の条件は何か? 導入遺伝子の発現量やその組み合わせはどのように影響するのか? 実際、導入遺伝子がどのように働いてiPS細胞化させているのか? 等々、解決すべき問題は尽きない。

3. iPS細胞の医療応用

iPS細胞化のプロセスやメカニズムの解析とはまったく独立して、iPS細胞として樹立させたものを出発点とし、これをさまざまな形で利用する方法の開発もiPS細胞研究の大きな柱である。上で述べた心血管細胞をはじめ、神経細胞、膵β細胞など、さまざまな臓器・組織がiPS細胞を用いた再生医学研究のターゲットとなる。

4. その他

「いったん分化した細胞を簡便にリプログラミングしてもとに戻すことができる」という新しい技術は、さまざまな研究に新しいストラテジーを提供する。リプログラミングそのものに関する研究はもちろんのこと、分化/脱分化におけるエピジェネティクス研究やがん化メカニズムの解析など、iPS細胞研究が新しい展開をもたらすと考えられる研究領域は数多く存在する。

おわりに

ほ乳類の成体の細胞がリプログラミングされて未分化なものに戻りうることはクローン羊ドリーによってすでに示されていたが、その後10年を経て報告されたヒトiPS細胞樹立の報告がそれを上回る反響を持って迎えられたのは、iPS細胞の持つ応用範囲の広さによるであろう。「世界中どこでも施行可能な簡単な方法で成人由来の分化細胞から未分化幹細胞を誘導できる」ということが、将来的に科学や社会に及ぼす影響は計り知れない。そこには当然、功罪両面が生まれてくることになる。それはすべて科学者と社会が自ら責任を負うものである。極端な熱狂や批判に走ることなく、冷静にかつ良識と叡知を持つ

てiPS細胞の今後に対応していくことが必要と考えられる。

文 献

- 1) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006 ; 126 : 663.
- 2) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007 ; 131 : 861.
- 3) Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007 ; 318 : 1917.
- 4) Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, et al. Flk1 positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 2000 ; 408 : 92.
- 5) Yamashita JK, Takano M, Hiraoka-Kanie M, et al. Prospective identification of cardiac progenitor potentials by a novel single cell-based cardiomyocyte induction. *FASEB J* 2005 ; 19 : 1534.
- 6) Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Schroeder T, et al. Adrenomedullin/cyclic AMP pathway induces Notch activation and differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 ; 26 : 1977.
- 7) Kono T, Kubo H, Shimazu C, et al. Differentiation of lymphatic endothelial cells from embryonic stem cells on OP9 stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 ; 26 : 2070.
- 8) Narazaki G, Uosaki M, Teranishi M, et al. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation* 2008 ; 118 : 498.
- 9) Mauritz C, Schwanke K, Reppel M, et al. Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation* 2008 ; 118 : 507.
- 10) Schenke-Layland K, Rhodes KE, Angelis E, et al. Reprogrammed mouse fibroblasts differentiate into cells of the cardiovascular and hematopoietic lineages. *Stem Cells* 2008 ; 26 : 1537.
- 11) Xie C, Huang H, Wei S, et al. A comparison of murine smooth muscle cells generated from embryonic versus induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 2008 ; 18 : 741.
- 12) Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, et al. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes : role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 2003 ; 107 : 2733.
- 13) Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, et al. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res* 2009 ; 104 : e30.
- 14) Tanaka T, Tohyama S, Murata M, et al. *In vitro* pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2009 ; 385 : 497.
- 15) Yokoo N, Baba S, Kaichi S, et al. The effects of cardioactive drugs on cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009 ; 387 : 482.
- 16) Taura D, Sone M, Homma K, et al. Induction and isolation of vascular cells from human induced pluripotent stem cells—brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009 ; 29 : 1100.
- 17) Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol* 2007 ; 25 : 1015.
- 18) Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Yamada S, et al. Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. *Circulation* 2009 ; 120 : 408.
- 19) Miura K, Okada Y, Aoi T, et al. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* 2009 ; 27 : 743.
- 20) Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2007 ; 1 : 39.
- 21) Nishikawa SI, Goldstein RA, Nierras CR. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008 ; 9 : 725.
- 22) Nakao Y, Narazaki G, Hoshino T, et al. Evaluation

- of antiangiogenic activity of azumamides by the *in vitro* vascular organization model using mouse induced pluripotent stem (iPS) cells. *Bioorg Med Chem Lett* 2008 ; 18 : 2982.
- 23) Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008 ; 26 : 101.
- 24) Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, et al. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 2008 ; 322 : 945.
- 25) Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 2008 ; 321 : 699.
- 26) Kaji K, Norrby K, Paca A, et al. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 2009 ; 458 : 771.
- 27) Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 2009 ; 324 : 797.
- 28) Zhou H, Wu S, Joo JY, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 2009 ; 4 : 381.
- 29) Li W, Wei W, Zhu S, et al. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* 2009 ; 4 : 16.
- 30) Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, et al. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* 2009 Aug 9. [Epub ahead of print]

* * *

iPS 細胞からの心血管細胞の分化誘導とその応用

山下 潤¹⁾

KEYWORDS 心筋前駆細胞, 動静脈リンパ管, サイクロスポリン A

はじめに

虚血性心疾患を中心とする心疾患および脳血管障害は日本における死因のそれぞれ第2位(10万対126)と3位(10万対102)を占め、両者を合わせると第1位の悪性新生物(癌)(10万対254)に肉薄する。一方、国民医療費では、虚血性心疾患と脳血管障害を合わせると悪性新生物を上回り(2兆5千億 vs 2兆3千億円)(以上、厚生労働省「平成16年度国民医療費の概況」)、心血管系疾患は、現在および未来にわたり日本の医療が取り組むべき最重要研究課題の一つと考えられる。

また、心筋症は原則的に心移植しか根治療法がなく、かつ日本における移植待機患者の9割を占める非常に重要な心再生医療のターゲットである。自国以外での臓器移植を原則禁止する方向のWHOの方針や日本における臓器移植法改正なども相俟って、幹細胞による心筋再生は医学的にも政治的にも重要性が増している。

近年の幹細胞生物学の発展を背景とした再生医療研究において、血管および心臓は最も急速に研究の進展が認められる臓器である。すなわち、様々な新しい心血管幹細胞・前駆細胞の発見や心血管分化機構の解析、さらには前駆細胞をヒトに用いた再生医療の試みまで、基礎研究から臨床応用に至る幅広い知見が蓄積されてきた。なかでも血管は、骨髓細胞や末梢血細胞の虚血組織への移植、という細胞移植治療がすでに臨床の場にも応用され成果を挙げており、近年の再生医療の発展

において先駆的役割を果たしている。

本稿はそのなかで万能の幹細胞として期待されるES細胞および最近樹立された新しい多能性幹細胞、iPS細胞からの心血管細胞分化誘導とその応用に関する知見を中心に概説する。

iPS 細胞からの心血管細胞分化

筆者らはこれまでマウスおよびヒトES細胞を用いて心血管細胞の分化再生研究を行ってきた。すなわち、マウス未分化ES細胞から血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)の受容体の一つであり、血管内皮・血球の前駆細胞や中胚葉細胞のマーカーでもあるFlk1(2型VEGF受容体: VEGF receptor-2)を発現する細胞を誘導し、Flk1陽性細胞を共通の前駆細胞として、血管内皮細胞、血管壁細胞、血球細胞、心筋細胞といった循環器系細胞を系統的に分化誘導することに成功している^{1,2)}。この新しい分化誘導システムを用いて、ES細胞由来の心筋前駆細胞の同定²⁾や動静脈リンパ管内皮細胞をそれぞれES細胞から誘導することにも成功している^{3,4)}。ヒトES細胞からの血管細胞の誘導や虚血モデルへの移植実験などにも関与している^{5,6)}(京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科との共同研究)。

このマウスES細胞の系統的な心血管細胞分化システムをマウスiPS細胞に導入し、筆者ら⁷⁾はいち早くiPS細胞からのこれら心血管細胞の分化誘導に成功した。すなわち、未分化マウスiPS細胞

1) YAMASHITA Jun 京都大学再生医科学研究所幹細胞分化制御研究領域・准教授

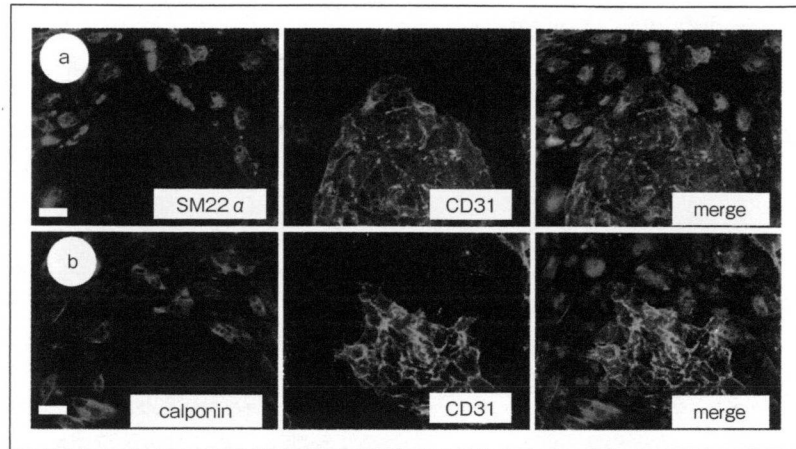


図1 マウス iPS 細胞からの血管内皮・壁細胞分化
 マウス iPS 細胞由来 Flk1 陽性細胞を VEGF および血清存在下で培養することにより、CD31 陽性内皮細胞(緑)と SM22 α (a)または calponin (b)陽性壁細胞(赤)が選択的に誘導される。スケールバー：50 μ m. [文献7)より改変引用]

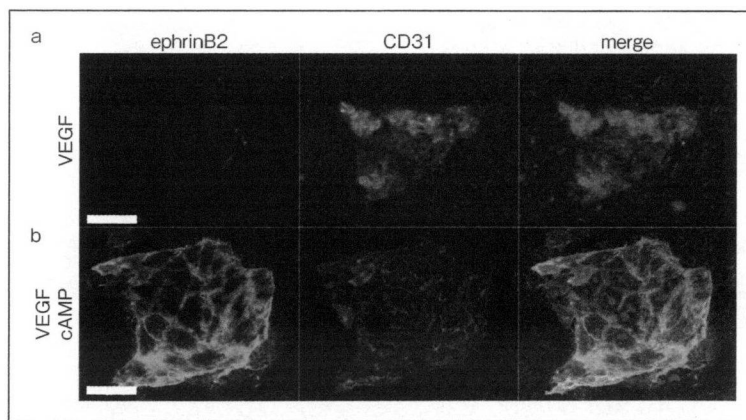


図2 マウス iPS 細胞からの動静脈内皮細胞分化
 Flk1 陽性細胞を VEGF および血清存在下で培養した場合、その大部分が CD31 陽性/ephrinB2 陰性の静脈内皮細胞となる(a)。VEGF に加え 8-bromo-cAMP を投与し cAMP シグナルを活性化すると CD31 陽性/ephrinB2 陽性動脈内皮細胞が出現する(b)。スケールバー：100 μ m. [文献7)より改変引用]

を LIF (leukemia inhibitory factor) 非存在下に培養することにより Flk1 陽性細胞が誘導された。

Flk1 陽性細胞を VEGF および血清存在下に培養することにより主に静脈を中心とする内皮細胞および壁細胞が(図1), VEGF に加えて cAMP シグナルを刺激することにより動脈内皮細胞が(図2), OP9 ストロマ細胞上で培養することにより血球, リンパ管内皮細胞(図3), および心筋細胞が(図4), それぞれ誘導された。マウス iPS

細胞からの Flk1 陽性細胞, (動静脈リンパ管)内皮細胞, 壁細胞の分化様式, 分化効率などはほとんどマウス ES 細胞と変わりがなかった。心筋細胞の誘導効率はややばらつきがみられたが, 従来マウス ES 細胞の株間に認められたばらつきと同程度以下であった。

このように, マウス ES 細胞とマウス iPS 細胞はほぼ完全に同等な心血管分化能と分化動態を示し, マウス ES 細胞と同様に系統的に心血管細胞

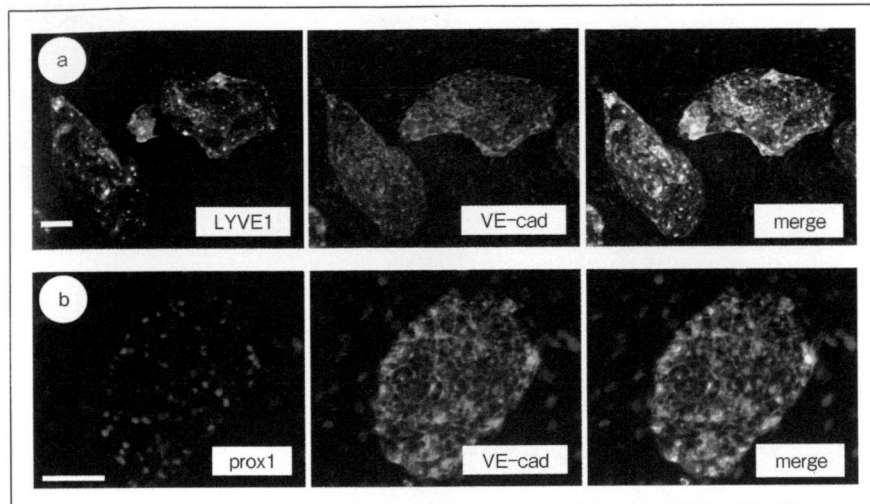


図3 マウス iPS 細胞からのリンパ管内皮細胞分化
Flk1 陽性細胞を OP9 ストロマ細胞上で培養することにより、LYVE1 陽性(a)または prox1 陽性(b)かつ VE-cad 陽性のリンパ管が誘導される。スケールバー：100 μm 。
〔文献7)より改変引用〕

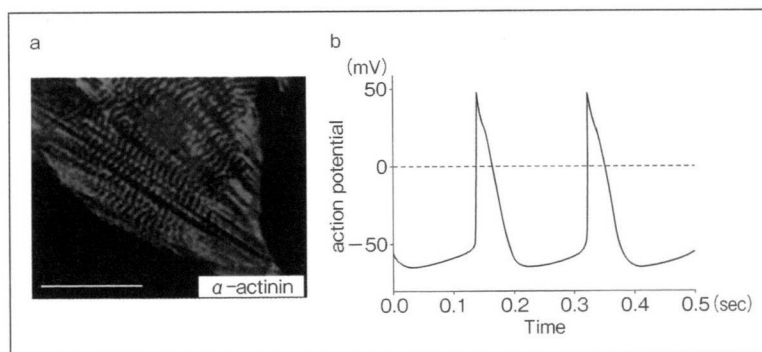


図4 マウス iPS 細胞からの心筋細胞分化
Flk1 陽性細胞を OP9 ストロマ細胞上で培養することにより、拍動心筋細胞が出現する。拍動細胞は sarcomere 構造を示し(a：赤； α -actinin 染色)、ペースメーカー細胞様の活動電位を示す(b)。スケールバー：25 μm 。〔文献7)より改変引用〕

を分化誘導することが可能であった(図5)。また、iPS 細胞由来細胞の胆嚢ヌードマウスへの細胞移植実験により、iPS 細胞由来血管細胞が内皮および壁細胞として生体内血管新生に寄与しうることも確認している(未発表)。

ただし、マウス iPS 細胞を樹立する際に外来性に導入された遺伝子群の発現が長期分化培養中に再上昇したようにみえる例が観察された。明らかに癌化したような細胞や未分化になった細胞が出

現することはなかったが、ES 細胞とは異なり iPS 細胞独特の問題である導入遺伝子の影響については慎重に対応する必要があると考えられた。

その後、山中らにより開発された c-myc を含まない iPS 細胞⁸⁾や導入遺伝子コピー数の少ない内臓由来 iPS 細胞⁹⁾、プラスミドのみで誘導された iPS 細胞¹⁰⁾でも同様に心血管細胞の誘導が可能であった(未発表)。すなわち、誘導方法が異なってもいったん iPS 細胞として樹立されれば、それ

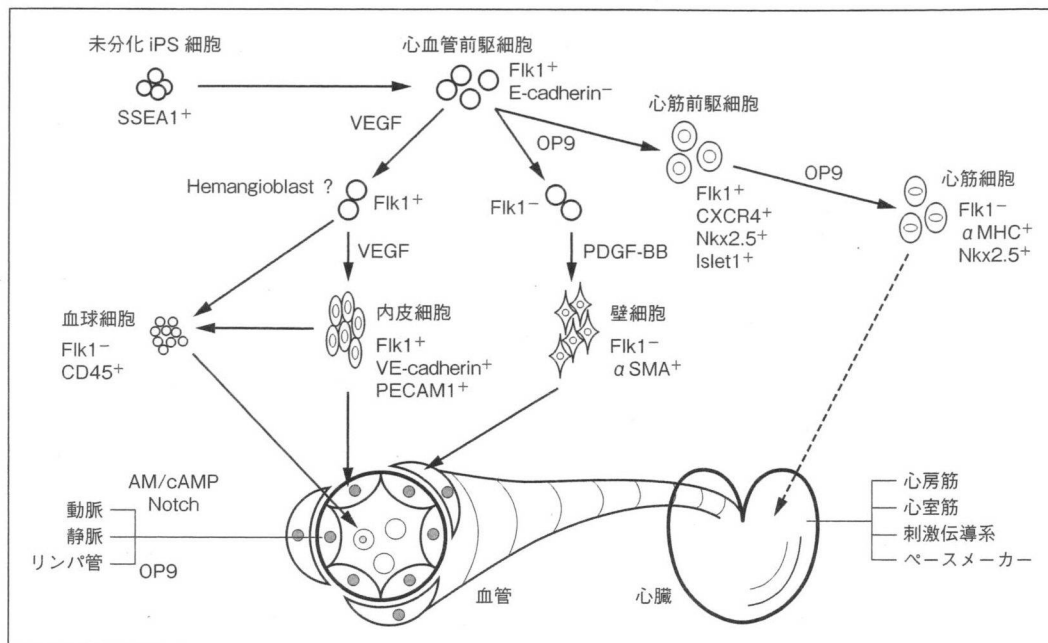


図5 マウス iPS 細胞からの系統的心血管細胞分化
 マウス iPS 細胞から誘導した Flk1 陽性細胞を共通の前駆細胞として、心血管系の構成細胞である血管内皮、壁細胞、心筋細胞、さらには動静脈リンパ管内皮細胞や種々の心筋細胞を系統的に分化誘導することができる。
 [文献7)より改変引用]

らの細胞はいずれも ES 細胞と同様の分化特性を示した。ほかにマウス iPS 細胞からの心血管細胞分化に関しては、心筋細胞を誘導したとの報告¹¹⁾および筆者らに類似した分化システムを用いた心血管細胞分化の報告¹²⁾と血管平滑筋分化の報告¹³⁾などがある。

ヒト iPS 細胞からの 心血管細胞分化

ヒト ES 細胞の維持培養条件に準じた環境で誘導・樹立されたヒト iPS 細胞は、その維持および分化誘導においてもヒト ES 細胞に類似した動態を示す。ヒト ES 細胞におけるノウハウを用いてヒト iPS 細胞からの心血管細胞の分化誘導が行われている。京都大学のグループ¹⁴⁾は、同グループおよび筆者らがマウス ES 細胞の方法をヒト ES 細胞に応用したのと同様の方法を用いて、ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞および壁細胞を誘導す

ることに成功した。ウィスコンシン大学のグループ¹⁵⁾も類似の方法で血球および内皮細胞の誘導を報告している。心筋に関しては、ウィスコンシン大学のグループ¹⁶⁾が胚様体法を用いて誘導した報告が最初である。慶応大学の Tanaka ら¹⁷⁾も胚様体を用いて誘導した心筋細胞を心筋の薬理学的検討に用いる試みを報告している。また、リプロセル社(東京)はヒト iPS 細胞から誘導した心筋細胞をキットとして販売するサービスを 2009 年より開始している。筆者らは、ヒト ES 細胞において報告されている心筋分化誘導法¹⁸⁾に準じて培養することにより、自己拍動する心筋細胞コロニーの誘導にすでに成功している。心筋に特徴的な sarcomere の形成や自己拍動に同調した Ca²⁺ の取り込みなど形態的機能的特性も確認している(投稿中)。

最近筆者ら¹⁹⁾は、免疫抑制剤サイクロスポリン A が強力な心筋および心筋前駆細胞誘導作用を有することを見いだし、マウス ES 細胞由来純化