

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07961

研究課題名(和文) 血液前駆細胞・心筋前駆細胞を分離可能なマーカー膜蛋白質の同定とその発現解析

研究課題名(英文) Identification and characterization of the cell surface marker protein that can distinguish between hematopoietic and myocardial progenitor cells

研究代表者

川端 健二 (KAWABATA, Kenji)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 幹細胞制御プロジェクト・プロジェクトリーダー

研究者番号：50356234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) はアデノウイルス(Ad)の受容体として同定された膜蛋白質である。ヒト ES/iPS細胞由来中胚葉(Flk1+)細胞において CAR の発現を解析したところ、Flk1+ 細胞中には CAR+ 細胞と CAR- 細胞の両細胞が存在した。また、Flk1+ かつ CAR+ 細胞(F+CAR+細胞)およびFlk1+ かつ CAR- 細胞(F+CAR-細胞)の分化能を評価したところ、F+CAR+細胞は心筋細胞への分化指向性を有し、F+CAR-細胞は血液・血管内皮細胞への分化指向性を有することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) was identified as adenovirus entry receptor. We found that there were CAR-positive and -negative cells in mesodermal (Flk-1 positive) cells derived from human ES and iPS cells. Flk-1-positive and CAR-positive cells could differentiate into myocardial progenitor cells. On the other hand, Flk-1-positive and CAR-negative cells could differentiate into hematopoietic and endothelial progenitor cells. These results suggest that CAR is an appropriate cell surface marker that can distinguish between hematopoietic and myocardial progenitor cells.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：分化 iPS細胞 中胚葉 血液 心筋

### 1. 研究開始当初の背景

血液細胞や心筋細胞は、発生学的には側板中胚葉由来の細胞である。側板中胚葉のマーカーは VEGF 受容体 Flk1 であり、実際に胚性幹 (ES) 細胞を用いた *in vitro* 分化誘導実験や *in vivo* トレース実験において、Flk1 発現 (+) 細胞が血液細胞や心筋細胞へ分化することが証明されている。一方、最近の研究から Flk1+細胞は血液前駆細胞や心筋前駆細胞等の分化能の異なる細胞種が混在したヘテロな細胞集団であると考えられるようになってきている。Flk1 高発現細胞が血液前駆細胞を多く含み、Flk1 低発現細胞が心筋前駆細胞を多く含んでいるとの報告もなされているが、Flk1 の発現量のみでこれらの前駆細胞の分離は困難であるため、新たなマーカー蛋白質を加えて区別することが望ましい。2011 年、マウスおよびヒト Flk1+細胞中の前駆細胞を分離可能な膜蛋白質として PDGFR $\alpha$  (Pa) が報告され、Pa+細胞は心筋細胞へ、Pa 非発現 (-) 細胞は血液細胞へ分化することが ES 細胞や人工多能性幹 (iPS) 細胞を用いた実験系により実証された (Kattman, 2011 Cell Stem Cell)。しかし、最近、マウス生体においては Pa+細胞も血液細胞へ分化することが報告され (Ding, 2013 Dev Dyn)、Flk1+中胚葉細胞に混在する前駆細胞を Pa では分離できない可能性が出てきた。

Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) はアデノウイルス (Ad) の受容体として同定され、その後の研究から、タイトジャンクション構成蛋白質として機能していることが報告された膜蛋白質である。成獣マウスにおいて、CAR は血液細胞では発現量が低く、その他の組織では幅広く発現している (Kawabata, 2007 Gene Ther)。また、胎児期においては、CAR は心臓において発現が高いこと、ならびに CAR 欠損マウスは心臓の発生異常により胎生致死を呈することが報告されており、CAR は心筋細胞の機能に重要な役割を担っていることが示唆される。しかし、胎児期において CAR を発現している細胞種や CAR の詳細な機能については不明な点が多い。

申請者らはこれまでに Ad ベクターを用いた遺伝子導入による ES/iPS 細胞の分化誘導研究を実施しており、その過程で、未分化 ES/iPS 細胞において CAR が高発現していることを見出した (Kawabata, 2005 Mol Ther; Tashiro and Kawabata, 2009 Stem Cells; Tashiro and Kawabata, 2010 Cell Reprogram)。また、最近申請者らはマウス ES/iPS 細胞由来分化細胞 (胚様体) には CAR+細胞と CAR-細胞が混在しており、CAR-細胞には血液前駆細胞が濃縮されていることを独自に見出した。これらの知見ならびに過去の情報から、申請者は、CAR の発現を指標にすることにより、Flk1+中胚葉細胞中の CAR+細胞を心筋細胞への分化能を有する細胞、Flk1+細胞中の CAR-細胞を血液細胞への分化能を有する細胞として分離可能

ではないかと考えた。そこで申請者は ES/iPS 細胞由来 Flk1+細胞において CAR の発現を解析したところ、Flk1+細胞中には CAR+細胞と CAR-細胞の両細胞が存在していること、そしてこれらの両細胞は造血系および心筋系の転写因子の発現パターンが大きく異なっていることを見出した。つまり、CAR の発現により二種に分別された Flk1+細胞は血液細胞と心筋細胞への分化能の異なる細胞集団であることが強く示唆された。一方、予備的な検討ではあるが、血液細胞へ分化することが報告されている上述の Flk1+Pa-細胞も CAR の発現により Flk1+Pa-CAR-細胞と Flk1+Pa-CAR+細胞に分離され、Flk1+Pa-CAR+細胞は Flk1+Pa+細胞と同等の心筋関連遺伝子の発現量を示していること確認した。つまり、CAR+細胞には心筋前駆細胞が濃縮されている可能性が考えられた。以上の結果より、CAR の発現量により分離される細胞集団の特性を詳細に解析し、初期発生時の CAR+細胞を特定することにより、発生学上の大きな発見が得られ、また iPS 細胞を用いた再生医療や創薬にも非常に有用であると考え、本研究課題の申請に至った。

### 2. 研究の目的

CAR はアデノウイルス (Ad) の受容体として同定され、その後の研究から、タイトジャンクション構成蛋白質として機能していることが報告された膜蛋白質であるが、CAR を発現している細胞種や CAR の詳細な機能については不明な点が多い。

申請者らはこれまでに Ad ベクターを用いた遺伝子導入による ES/iPS 細胞の分化誘導研究を実施しており、その過程で、未分化 ES/iPS 細胞において CAR が高発現していることを見出した。また、最近申請者らはマウス ES/iPS 細胞由来分化細胞 (胚様体) には CAR+細胞と CAR-細胞が混在しており、CAR-細胞には血液前駆細胞が濃縮されていることを独自に見出した。これらの知見ならびに過去の情報から、申請者は、CAR の発現を指標にすることにより、Flk1+中胚葉細胞中の CAR+細胞を心筋細胞への分化能を有する細胞、Flk1+細胞中の CAR-細胞を血液細胞への分化能を有する細胞として分離可能ではないかと考えた。

### 3. 研究の方法

Flk1+CAR+ (F+CAR+) 細胞、Flk1+CAR- (F+CAR-) 細胞にどのような細胞が含まれているか検討するため、マウス ES/iPS 細胞由来 F+CAR+細胞および F+CAR-細胞を単離し、造血系転写因子 (Scf や Runx1 等) や心筋前駆細胞関連因子 (Tbx5 や Nkx2.5 等) の発現量を定量的 PCR 法により解析した。さらにメチルセルロースを用いたコロニーアッセイ法を行い、単離した細胞に含まれる未熟な血液細胞を検出する。また、マウス ES/iPS 細胞

胞由来 FIK1+細胞は OP9 ストロマ細胞上で培養することにより、血液細胞や心筋細胞へ分化することが報告されているため、分離した F+CAR+細胞、F+CAR-細胞を OP9 細胞と共培養した場合の血液細胞、心筋細胞への分化能を解析した。また、血液細胞や心筋細胞だけでなく、血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞、平滑筋細胞への分化能も併せて検討した。ヒト ES/iPS 細胞を使用する場合は、VEGF や線維芽細胞増殖因子 (FGF) 2 を含む無血清培地中で接着培養することにより、心筋細胞や血管内皮細胞への分化能を評価した。

生体においても F+CAR+細胞と F+CAR-細胞が存在しているか否かを調べるため、マウス E7.5 ~ E9.5 の胎児を用いて両細胞の検出を行った。最近、C57BL/6 マウス由来 E8.5 の胎児においても F+CAR+細胞、F+CAR-細胞が存在することを確認した。今回更に、時期ならびにマウス系統を変えた場合にも同様に検出されるかどうか検討した。そして胎児由来 F+CAR+細胞、F+CAR-細胞を単離し、先と同様の手法により分化能を評価することで、マウス生体においても CAR の発現により血液細胞系譜と心筋細胞系譜を分離可能なことを示した。また、胎児の組織切片を作製して F+CAR+細胞が心筋前駆細胞マーカー (Nkx2.5 や Is1 等) を発現しているかどうかを免疫染色法により解析した。

#### 4. 研究成果

血液細胞や心筋細胞は、発生学的には側板中胚葉由来の細胞である。側板中胚葉のマーカーは VEGF 受容体 FIK1 であり、FIK1 発現 (+) 細胞が血液細胞や心筋細胞へ分化することが証明されている。一方、最近の研究から FIK1+ 細胞は血液前駆細胞や心筋前駆細胞等の分化能の異なる細胞種が混在したヘテロな細胞集団であると考えられているため、新たなマーカー蛋白質を加えて FIK1+ 細胞をさらに細かく区別することが望ましい。

Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) はアデノウイルス (Ad) の受容体として同定され、その後の研究から、タイトジャンクション構成蛋白質として機能していることが報告された膜蛋白質である。ヒト ES/iPS 細胞由来 FIK1+ 細胞において CAR の発現を解析したところ、FIK1+ 細胞中には CAR+ 細胞と CAR- 細胞の両細胞が存在していること、そしてこれらの両細胞は造血系および心筋系の転写因子の発現パターンが大きく異なっていることを見出した。また、FIK1+ かつ CAR+ 細胞 (F+CAR+細胞) および FIK1+ かつ CAR- 細胞 (F+CAR-細胞) の分化能を評価したところ、F+CAR+細胞は心筋細胞への分化指向性を有し、F+CAR-細胞は血液・血管内皮細胞への分化指向性を有することが明らかとなり、CAR は FIK1 陽性中胚葉細胞をさらに細かく分別可能なマーカーとなり得ることが明らかとなった。また、胎生 8.5 日のマウスにおいても FIK1+細胞を CAR+

細胞と CAR 陰性細胞に分別できることが明らかとなり、それぞれ心筋細胞指向性、血液細胞指向性を示した。したがって、生体においても CAR は中胚葉系細胞を細かく分別できるマーカーとなり得ることが示された。

FIK1 陽性細胞の中に CAR 陽性細胞と CAR 陰性細胞が存在することが示され、in vivo (マウス生体) においても同様のことがいえるかどうか確認できた。マウスおよびヒト FIK1+ 細胞中の前駆細胞を分離可能な膜蛋白質として PDGFRa (Pa) が報告され、Pa+ 細胞は心筋細胞へ、Pa 非発現 (-) 細胞は血液細胞へ分化することが ES 細胞や iPS 細胞を用いた実験系により実証されている。したがって、今後は FIK1 陽性細胞中の Pa の発現と CAR の発現細胞について解析していきたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Okada A., Tashiro K., Yamaguchi T., Kawabata K. Selective differentiation into hematopoietic and cardiac cells from pluripotent stem cells based on the expression of cell surface markers. *Methods Mol. Biol.*, 査読有, 1341, 181-195, 2016.

DOI:10.1007/7651\_2015\_232

Tashiro K, Hirata N, Okada A, Yamaguchi T, Takayama K, Mizuguchi H, Kawabata K. Expression of coxsackievirus and adenovirus receptor separates hematopoietic and cardiac progenitor cells in fetal liver kinase 1-expressing mesoderm. *Stem Cells Transl Med.*, 査読有, 4, 424-436, 2015. DOI:10.5966/sctm.2014-0173

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.nibiohn.go.jp/Proj3HP/studies.html>

#### 6. 研究組織

(1) 川端 健二 (KAWABATA, Kenji)  
国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 幹細胞制御プロジェクト プロジェクトリーダー  
研究者番号： 5 0 3 5 6 2 3 4

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )