

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20249046

研究課題名（和文） ヒト心臓内幹細胞の増殖・分化誘導因子の発見と心筋分化初期プライミング因子の探索

研究課題名（英文） Identification of priming factors that determine cardiac lineage of cardiac stem cells

研究代表者

松原 弘明 (Matsubara Hiroaki)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：10239072

研究成果の概要（和文）：ヒト心筋生検組織より単離した心筋分化可能な多能性間葉系幹細胞(CSC)より得た cDNA のサブトラクションスクリーニング法とディファレンシャルスクリーニング法を組み合わせる事によって、「初期プライミング因子」群の候補になりえる 6 因子同定した。そのなかでも、比較的新規とされる骨形成タンパク質(BMP)結合タンパク質である crossveinless-2(Cv2)に注目し解析を進めた。心臓発生過程では初期胚の側方に位置する心臓発生領域において、間葉系細胞が周囲の内胚葉／外胚葉から分泌される細胞増殖因子(BMP 等)の刺激により転写因子活性を生じ、多くの遺伝子の段階的で複雑な働きが開始されることにより心筋細胞が分化するとされる。従って BMP 結合タンパク質は間違いなく重要な役割を果たしていると考えられる。

Cv2 について H21 年度に得られた研究成果として、(1)発生過程において 2 相性に発現し、BMP 結合タンパク質で BMP 情報伝達系の阻害物質である Noggin と同様に、Cv2 が BMP 情報伝達系の抑制作用を持つことを明らかにした。(2)内因性 Cv2 の役割を検討するために、RNAi の手法を用いて心筋細胞分化発生初期の Cv2 の発現を抑制したところ、幹細胞の心筋細胞への分化が著しく阻害された。(3)遺伝子レベルの検討では、当該幹細胞は心臓中胚葉に分化するよりもむしろ内胚葉に分化していた。(4)さらに Cv2 蛋白を外的に添加することで分化過程がほぼリバースされる事が明らかになった。以上の事より心筋細胞分化プロセスにおいて初期中胚葉誘導期には BMP 感受性の重要な過程が存在し、初期プライミング因子群の一つである Cv2 はこの過程において心臓中胚葉への道標的な役割を果たしていることが想定される。これらの解析は、心筋再生医学のネックとも言えるセルソース（再生治療用細胞資源）の問題を解決する糸口を得る突破口になる可能性があると考えている。

研究成果の概要（英文）：Increasing evidence indicates that bone morphogenetic proteins (BMPs) are crucial for cardiac induction, specification, and development. Although signaling of BMPs is tightly regulated through soluble BMP-binding proteins, how they regulate BMP signaling during cardiac differentiation remains unknown. To identify molecules responsible for BMP signaling during early cardiomyocyte differentiation of P19 cells, cDNA subtraction was performed. We found a bimodal expression of the BMP-binding protein Crossveinless-2 (Cv2) during cardiomyocyte differentiation; Cv2 is temporally expressed earlier than cardiac transcription factors such as Nkx2.5 and Tbx5 and acts as a suppressor for BMP signaling in P19 cells. We established a P19 clonal cell line harboring a cardiac alpha-myosin heavy chain promoter-driven enhanced green fluorescent protein gene to monitor cardiac differentiation by flow cytometry. Treatment with BMP2 during the first 2 days of differentiation suppressed cardiomyocyte differentiation through activation of down-stream targets Smad1/5/8 protein and Id1 gene, whereas treatment with Cv2 conversely inhibited Smad1/5/8 activation and Id1 expression, leading to increased generation of cardiac cells. RNA interference-mediated knockdown (KD) of endogenous Cv2 showed increased Smad1/5/8 activation and impaired cardiomyocyte differentiation. Expression of cardiac mesoderm markers was reduced, whereas expression of Id1 and endoderm markers such as Sox7, Hnf4, and E-cadherin was induced in Cv2-kinase dead

cells. These phenotypes were rescued by the addition of Cv2 protein to the culture media during the first 2 days of differentiation or co-culture with parental cells. These data suggest that Cv2 may specify cardiac mesodermal lineage through inhibition of BMP signaling at early stage of cardiogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	15,800,000	4,740,000	20,540,000
2009年度	14,400,000	4,320,000	18,720,000
2010年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
年度			
年度			
総計	37,400,000	11,220,000	48,620,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：再生医学、循環器・高血圧、内科、臨床、心筋幹細胞

1. 研究開始当初の背景

私達は世界で初めてヒト心筋生検組織より無血清浮遊培養 spheroid 形成法にて、心筋分化可能な多能性間葉系幹細胞(CSC)の単離・増幅に成功した(J Cell Sci 2007;120:1791, BBRC 2007;352:635)。しかし、この幹細胞の心筋分化効率は 1-2%と低く、増殖能も遅く、世界中が心筋分化誘導・増殖促進因子を探索している。本研究は、申請者らが成人ヒト心筋より単離成功した2つの新規の心筋分化・増殖誘導因子(Cv2, MuRC)を中心に、初期心筋分化プライミング因子群の解析、次世代心筋再生医療の開発を目指した。

2. 研究の目的

下記の4つのプロジェクトを研究の主目的とする。

- 1) ヒト心臓内幹細胞の自己増殖促進因子である bFGF とその受容体(FGFR1)との complex を用いた新たな心筋幹細胞固有増殖因子の単離と機能解析
- 2) 成人ヒト心筋より単離に成功した新規2遺伝子：bone morphogenetic protein (BMP)抑制蛋白 cross veinless(Cv)-2、心臓 Z-disk 特異的に発現する muscle-restricted coiled-coil protein (MuRC)による心筋幹細胞の高率な心筋分化誘導
- 3) BMP 抑制蛋白 Cv-2 を用いた心筋細胞分化初期プライミング因子群の機能解析

3. 研究の方法

- 1) ヒト心臓内幹細胞より bFGF 依存性に活性

化される増殖因子の単離。ヒト心臓内幹細胞(hCSCs)に human FGFR1 を人工的に遺伝子導入後、bFGF 添加培養中の培養血清中に検出される分泌蛋白の同定を行う。比較対照の control として、bFGF/FGFR1 complex のない幹細胞の培養血清のほかに、検出力の特異性を高めるために、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hBMCs)も比較対照細胞として解析し、subtraction 法にて、より精度の高いスクリーニングを行う。hCSCs と hBMCs にそれぞれ bFGF/FGFR1 complex 導入の有無により、4群間での網羅的遺伝子検索を以下のように行う。Affymetrix GeneChip Mouse Expression Set430 のマイクロアレイにて網羅的に検索：G2500A gene array スキャナーにてイメージを取り込み、MAS 5.0 にて遺伝子データを定量化し、5倍以上と有意に変化した遺伝子に注目して解析作業を行う。SAGE ライブラリーを作製し、塩基配列をシーケンサーにより決定する。得られたシーケンスデータと NCBI (National Center for Biotechnology Information) の SAGEmap Reference Sequence Database と比較することにより、各 SAGE タグの塩基配列を同定する。定量的遺伝子解析ソフトを用い、各遺伝子発現の変化を解析し、既知及び未知の遺伝子を同定する。

2) MuRC との特異的結合蛋白を同定し心筋分化初期プライミング因子解明する

心筋細胞のサルコメアの両端に位置する Z-disc は、心筋の伸展を感知し、肥大や生存のためのシグナルを伝達し、心不全発症に重要な役割を担っている。申請者らは、成人心臓に発現している遺伝子の網羅的な探索を

行い、心臓、骨格筋、血管平滑筋にのみ発現している筋細胞特異的新規遺伝子 MuRC の単離に成功した

MuRC は α -actinin の局在と一致して心筋 Z-disc に存在した。Tg-MuRC は著明な心筋細胞肥大と心電図上 PR 間隔の延長を認め、完全房室ブロックや心房細動を呈した。さらに、MuRC-Tg は心筋間質の著明な線維化と拡張した左心室径および低下した心駆出率も示した。MuRC は Z-disk 存在蛋白であるため、まず MuRC-Tg で発症した心筋肥大誘導と心房細動の原因遺伝子の同定や心不全という表現型解析のため、MuRC-Tg 群と NT-g 群の左房と左室のそれぞれから mRNA を回収し、Affymetrix GeneChip Mouse Expression Set430 のマイクロアレイにて遺伝子群を網羅的に検索する。MuRC は Z-Disk に存在するので、yeast-two hybrid 法にて結合蛋白も同定する。

3) BMP 拮抗作用を持つ cv-2 の心臓内幹細胞の筋細胞分化促進の検討と cv-2 依存性筋細胞分化モデルを用いた初期プライミング因子群の機能解析。全能幹細胞に筋分化特異的遺伝子のプロモーター下に蛍光タンパク質を発現する遺伝子を導入、筋分化過程にある細胞の挙動をリアルタイムに観察可能で、ハイスループットな探索に対応できる幹細胞筋分化モデルを確立する。探索ソースとしては、筋細胞分化初期以前の過程にある P19 細胞より抽出した mRNA プールを用い、既知の cDNA を積極的に排除した cDNA ライブラリーに対しての cDNA サブトラクションスクリーニング法とディファレンシャルスクリーニング法を組み合わせる事によって、新規遺伝子を含む「初期プライミング因子」群の候補になりえる因子群を単離同定する。予備実験において、「初期プライミング因子」の候補因子を既に 6 因子同定している。過剰発現系では、通常的心筋細胞分化過程よりも早く分化させ、また分化効率を上昇させる分子が含まれる事を発見している。逆にアンチセンス遺伝子を用いた発現抑制系では心筋細胞分化過程を全く生じさせない分子が含まれる事も確認している。そのなかでも、比較的新規とされる骨形成タンパク質 (BMP) 結合タンパク質である crossveinless-2 (Cv2) に注目し解析を進める。

4. 研究成果

ヒト心筋生検組織より単離した筋分化可能な多能性間葉系幹細胞 (CSC) より得た cDNA のサブトラクションスクリーニング法とディファレンシャルスクリーニング法を組み合わせる事によって、「初期プライミン

グ因子」群の候補になりえる 6 因子同定した。そのなかでも、比較的新規とされる骨形成タンパク質 (BMP) 結合タンパク質である crossveinless-2 (Cv2) に注目し解析を進めた。心臓発生過程では初期胚の側方に位置する心臓発生領域において、間葉系細胞が周囲の内胚葉/外胚葉から分泌される細胞増殖因子 (BMP 等) の刺激により転写因子活性を生じ、多くの遺伝子の段階的で複雑な働きが開始されることにより筋細胞が分化するとされる。従って BMP 結合タンパク質は間違いなく重要な役割を果たしていると考えられる。

Cv2 について H21 年度に得られた研究成果として、(1) 発生過程において 2 相性に発現し、BMP 結合タンパク質で BMP 情報伝達系の阻害物質である Noggin と同様に、Cv2 が BMP 情報伝達系の抑制作用を持つことを明らかにした。(2) 内因性 Cv2 の役割を検討するために、RNAi の手法を用いて筋細胞分化発生初期の Cv2 の発現を抑制したところ、幹細胞の筋細胞への分化が著しく阻害された。(3) 遺伝子レベルの検討では、当該幹細胞は心臓中胚葉に分化するよりもむしろ内胚葉に分化していた。(4) さらに Cv2 蛋白を外的に添加することで分化過程がほぼリバースされる事が明らかになった。以上の事より筋細胞分化プロセスにおいて初期中胚葉誘導期には BMP 感受性の重要な過程が存在し、初期プライミング因子群の一つである Cv2 はこの過程において心臓中胚葉への道標的な役割を果たしていることが想定される。これらの解析は、筋再生医学のネックとも言えるセルソース (再生治療用細胞資源) の問題を解決する糸口を得る突破口になる可能性があると考えている。

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)

1. Klotho is Associated with VEGF Receptor-2 and Transient Receptor Potential Canonical-1 Ca^{2+} Channel to Maintain Endothelial Integrity. Kusaba T, Matsubara H (他 8 人、最終著者) Proc Natl Acad Sci USA 査読有 in press
2. PARM-1 is an endoplasmic reticulum molecule involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in rat cardiac myocytes. Isodono K, Matsubara H (他 8 名、最終著者) PLoS ONE 査読有 5:e9746-50, 2010
3. Bone marrow AT1 augments neointima formation by promoting mobilization of smooth muscle progenitors via platelet-derived SDF-1 α .

- Yokoi H, Matsubara H (他12人、最終著者)
Arterioscler Thromb Vasc Biol 査読有
30:60-7, 2010
4. p53 and TIGAR regulate cardiac myocyte energy homeostasis under hypoxic stress
Kimata M, Matoba S (他 12 人、2 番目),
Matsubara H (最終著者)
Am J Physiol Heart Circ Physiol 査読有 in press
 5. Paracrine osteogenic signals via bone morphogenetic protein-2 accelerate the atherosclerotic intimal calcification in vivo. Nakagawa Y, Ikeda K (他 10 人、2 番目), Matsubara H (最終著者)
Arterioscler Thromb Vasc Biol 査読有
30:1908-15, 2010
 6. Pressure-mediated hypertrophy and mechanical stretch induces IL-1 release and subsequent IGF-1 generation to maintain compensative hypertrophy by affecting Akt and JNK pathways.
Honsho S, Matsubara H (他 10 人、最終著者)
Circ Res 査読有 105:1149-58, 2009
 7. Bone marrow angiotensin AT1 receptor regulates differentiation of monocyte lineage progenitors from hematopoietic stem cells. Tsubakimoto Y, Matsubara H (他 12 人、最終著者)
Arterioscler Thromb Vasc Biol 査読有
29:1529-36, 2009
 8. Endothelium-targeted overexpression of constitutively active FGF receptor induces cardioprotection in mice myocardial infarction. Matsunaga S, Matsubara H (他 7 人、最終著者)
J Mol Cell Cardiol 査読有 46:663-73, 2009
 9. Identification of ARIA regulating endothelial apoptosis and angiogenesis by modulating proteasomal degradation of cIAP-1 and cIAP-2.
Ikeda K (他 10 人、1 番目), Matsubara H (最終著者)
Proc Natl Acad Sci USA 査読
106:8227-32, 2009
 10. Prorenin induces ERK activation in endothelial cells to enhance neovascularization independently of the renin-angiotensin system.
Uraoka M, Ikeda K (他 9 人、2 番目),
Matsubara H (最終著者)
Biochem Biophys Res Commun 査読有 390:1202-7, 2009
 11. Replicative senescence of vascular smooth muscle cells enhances the calcification through initiating the osteoblastic transition. Ikeda K (他 10 人、2 番目), Matsubara H (最終著者)
Am J Physiol Heart Circ Physiol
297:H1673-84, 2009
 12. Deficiency of nectin-2 leads to cardiac fibrosis and dysfunction under chronic pressure overload.
Satomi-Kobayashi S, Ueyama T (他 11 人、2 番目), Matsubara H (9 番目)
Hypertension 査読有 54:825-831, 2009
 13. Controlled delivery of basic fibroblast growth factor promotes human cardiosphere-derived cell engraftment to enhance cardiac repair for chronic myocardial infarction.
Takehara N, Matsubara H (他 13 人、最終著者)
J Am Coll Cardiol 査読有 52:1858-1865, 2008
 14. Crossveinless-2 controls bone morphogenetic protein signaling during early cardiomyocyte differentiation in P19 cells. Harada K, Matsubara H (他 5 人、最終著者)
J Biol Chem 査読有
283:26705-26713, 2008
 15. Downregulation of Dicer expression by serum withdrawal sensitizes human endothelial cells to apoptosis.
Matsubara H (他 8 人、最終著者)
Am J Physiol 査読有 295:H2512-21, 2008
 16. MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein that modulates the Rho/ROCK pathway, induces cardiac dysfunction and conduction disturbance.
Ueyama T (他 9 人、2 番目), Matsubara H (10 番目)
MolCellBiol 査読有 28:3424-3436, 2008
 17. MURC, a muscle-restricted coiled-coil

protein, is involved in the regulation of skeletal myogenesis.

Ueyama T (他 8 人、2 番目), Matsubara H (9 番目)

Am J Physiol 査読有 295: C490-C498, 2008

18. Central role of calcium-dependent tyrosine kinase PYK2 in endothelial nitric oxide synthase-mediated angiogenic response and vascular function.

Matsui A, Matsubara H (他 17 人、最終著者)

Circulation 査読有 116:1041-51, 2007

19. Single cardiac stem cells are regulated by stem cell antigen-1 signaling for efficient cardiovascular regeneration.

Tateishi K, Matsubara H (他 9 人、最終著者)

J Cell Sci 査読有 120:1791-1800, 2007

20. Stage-specific role of endogenous Smad2 activation in cardiomyogenesis of embryonic stem cells.

Ueyama T (他 8 人、7 番目), Matsubara H (最終著者)

Circ Res 査読有 101:78-87, 2007

[雑誌論文] (計 20 件)

1. Klotho is Associated with VEGF Receptor-2 and Transient Receptor Potential Canonical-1 Ca^{2+} Channel to Maintain Endothelial Integrity. Kusaba T, Matsubara H (他 8 人、最終著者)

[学会発表] (計 25 件)

1. 欧州心臓病学会 (ESC) 2010 年 9 月 1 日 STOCKHOLM
Effect of Valsartan on cardiovascular outcomes events in patients with high-risk hypertension : updated analysis of the KYOTO HEART STUDY.

[図書] (計 14 件)

1. 心筋由来幹細胞移植による世界初の心筋再生療法 CARDIAC PRACTICE
谷口法正、竹原有史、松原弘明
(株)メディカルレビュー社
2010. pp55-59

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

1. 名称: 細胞移植療法に用いられる心疾患治療薬

発明者: 松原弘明

権利者:

種類: 国際出願

番号: PCT/JP2008/068809

出願年月日: 2008 年 10 月 9 日

国内外の別: 国際特許

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松原 弘明 (Matsubara Hiroaki)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号: 10239072

(2) 研究分担者

上山 知己 (Ueyama Tomomi)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号: 80379388

(3) 研究分担者

的場 聖明 (Matoba Satoaki)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号: 10305576

(4) 研究分担者

天野 克也 (Amano Katsuya)

京都府立医科大学・医学研究科・博士研究員

研究者番号: 70468263