

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460083

研究課題名(和文) 多能性幹細胞のAW551984による心筋分化制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism for the cardiomyogenic effect of AW551984 on pluripotent stem cells

研究代表者

安田 智 (Yasuda, Satoshi)

国立医薬品食品衛生研究所・再生・細胞医療製品部・室長

研究者番号：20381262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：多能性幹細胞から心筋細胞を作製し、心機能不全の治療に用いる試みが盛んに行われている。近年、様々な細胞シグナルが心筋細胞分化に重要な役割を果たすことが明らかになったが、その詳細な分子メカニズムは不明な点が多い。我々は、マウスES細胞の心筋細胞分化の制御因子としてAW551984を既に見出し、本研究ではAW551984に結合するタンパク質を同定した。さらに、これら結合タンパク質の心筋細胞分化に及ぼす影響を検討し、分化制御に関わるものを抽出した。また、ヒトホモログVWA5Aも同様にヒトiPS細胞における心筋分化に関与することを示した。

研究成果の概要(英文)：To repair functions of the injured heart, a great deal of research has attempted to develop regenerative medicine using pluripotent stem cell-based cardiomyocytes as cell therapy products. Although several cell signals have been reported to play important roles in cardiac differentiation, its detailed molecular mechanism remains unknown. We have previously showed AW551984 as a regulator of cardiomyogenesis, and here identified AW551984-binding proteins (AW551984-BPs), which expressed in embryoid bodies of mouse embryonic stem (ES) cells. We further extracted several AW551984-BPs involved in regulation of cardiomyogenesis in mouse ES cells. We also indicated that human homolog VWA5A modulated in vitro cardiac differentiation of human iPS cells.

研究分野：再生医療

キーワード：多能性幹細胞 心筋分化

## 1. 研究開始当初の背景

多能性幹細胞である胚性幹細胞 (ES 細胞) および人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、様々な細胞に分化することができる多能性と半永久的な増殖性を有することから、再生医療における細胞・組織加工製品の原材料として非常に期待されている。現在世界中の研究機関で、多能性幹細胞の *in vitro* でのあらゆる細胞への分化に関する研究が精力的に行われているが、新たな細胞への分化方法の開発と分化効率の向上を目指した研究が多い。さらに多能性幹細胞の分化メカニズムを解析した基礎研究においては、遺伝子組換えマウスに由来する ES 細胞を利用したものや、エピジェネティクスの観点からのアプローチが精力的に行われている。しかしながら生化学的アプローチを加えた分化制御の分子メカニズム解析は、ほとんど行われていない。

我々の研究室では、マウスの胚性癌細胞 (EC 細胞) 株の心筋分化能の違いを利用した網羅的な遺伝子発現解析により、心筋分化に関わる 24 遺伝子を同定した (Yasuda et al. *Biochem J*, 2011)。さらに siRNA による遺伝子発現抑制によりこれらの遺伝子群のマウス ES 細胞における心筋分化への影響を検討し、EC 細胞および ES 細胞の心筋分化制御遺伝子として最終的に 3 つの遺伝子に絞り込んだ。それらの一つである AW551984 は、ES 細胞の未分化能維持と心筋前駆細胞への分化には関与せず、心筋前駆細胞から心筋細胞への分化の制御を行うことが明らかになった。新規の心筋分化制御因子として同定された AW551984 の遺伝子産物は、Vault protein inter-alpha-trypsin (VIT) ドメインを有する 85 kDa のタンパク質である。ヒトホモログである Von Willebrand Factor A Domain Containing 5A (VWA5A) は、がん抑制遺伝子として報告されているが、VWA5A の発がん抑制における分子メカニズムは不明である。また VIT ドメインから予測される発がん抑制および幹細胞分化に関わる機能は知られていない。既に我々は、AW551984 が Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナルに反応して発現量が上昇し、さらに心筋特異的転写因子である Nkx2.5 の mRNA 発現量を調節することを明らかにした。しかしながら、AW551984 がどのようなメカニズムで心筋特異的転写因子の発現を調節するのかは、不明のままである。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、1) AW551984 の心筋細胞分化制御における分子メカニズムを解明することと、2) ヒト多能性幹細胞においても AW551984 は心筋細胞分化を制御するのかを明らかにすることである。

1) AW551984 による分化制御メカニズムの解明のためには、AW551984 と相互作用するタンパク質を同定する必要がある。AW551984 VIT ドメインのリコンビナントタンパク質を用いて、分化させたマウス ES 細胞の細胞溶解液よりプルダウンアッセイを行い、LC-MS/MS 解析により AW551984 VIT ドメイン結合タンパク質を同定する。これらの AW551984 結合タンパク質が、AW551984 と同様に心筋分化制御に関わるかを確認し、分子メカニズムの解析を行う。結合タンパク質の機能に依存した解析を行うことにより、AW551984 の心筋分化制御機構を分子レベルで明らかにすることを目指す。

2) ヒトの ES 細胞や iPS 細胞は、シングルセルに分散するとアポトーシスを起こすなど、マウスの ES 細胞や iPS 細胞と異なる点が多い。したがって多能性幹細胞においては、マウス細胞で観察された現象はヒト細胞においても検証する必要がある。ヒト iPS 細胞で VWA5A の発現抑制を行い、心筋分化における影響を検討する。

## 3. 研究の方法

### 1) マウス ES 細胞の培養と分化

マウス ES 細胞 (R1) は ESGRO Complete PLUS Clonal Grade Medium で維持・培養を行った。R1 細胞は Accutase で剥離・分散し、丸底 PrimeSurface で胚葉体を形成させ、5 日目以降にゼラチンでコートした 48 穴プレートで培養を行った。分化 8 日後および 10 日後の拍動する胚葉体の個数をカウントし、その割合を算出した。

### 2) siRNA のトランスフェクション

$5 \times 10^5$  個の R1 細胞に 50 nM Stealth RNAi siRNA を Lipofectamine RNAiMAX によって導入し、24 時間後にこれら細胞を実験に用いた。

### 3) 細胞分画

胚葉体の形成開始から 10 日後に細胞を回収し、Accutase で分散し、 $1 \times 10^6$  個の細胞を、ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit で分画し、ウェスタンブロットを行った。

### 4) 定量 RT-PCR

総 RNA は RNeasy Mini Kit で抽出した。1 ステップ定量 RT-PCR は、QuantiTect Probe RT-PCR kit を用いて行った。標的遺伝子の発現は GAPDH mRNA 量で補正した。

### 5) 蛍光顕微鏡観察

35 mm ガラスボトムディッシュ上に播種した NIH3T3 細胞に、pEF1 $\alpha$ -AcGFP1-C1 または pEF1 $\alpha$ -AcGFP1-C1-AW551984 を LipofectAMINE 3000 を用いて導入し、48 時間後に 4% パラホルムアルデヒド/PBS で固定し、蛍光顕微鏡で観察を行った。

### 6) プルダウンアッセイおよびタンパク質の同定

R1 細胞から作製した胚葉体の溶解液 (5 mg protein) に、25  $\mu$ g の大腸菌から精製した GST または GST-AW551984-VIT を加え、4°C で 1 時間インキュベートし、Glutathione Sepharose 4B により GST タンパク質を精製した。GST および GST-AW551984-VIT に結合したタンパク質は、SDS-PAGE で分離し、銀染色されたバンドを切り出し、トリプシン処理後に LC-MS/MS で同定した。

#### 7) ヒト iPS 細胞の培養と分化

ヒト iPS 細胞 253G1 株は、Primate ES Cell Medium/MEF もしくは mTeSR1 培地で培養した。胚葉体を作製するため、フィーダー上で培養した 253G1 株を CTK 溶液で処理し、Ultra-low attachment 6-well plate で 20 日間培養した。

#### 8) shRNA 導入

VWA5A を標的とする shRNA またはコントロール shRNA のレンチウイルスを、6  $\mu$ g/ml hexadimethrine bromide の存在下で、50MOI となるように 253G1 細胞に感染させた。導入細胞は、1  $\mu$ g/ml puromycin dihydrochloride で選択を行った。

#### 4. 研究成果

AW551984 は、Vault protein inter-alpha-Trypsin (VIT) および von Willebrand type A (VWA) ドメインを有する 763 アミノ酸のタンパク質である。最初に AW551984 の細胞内局在を明らかにするため、AcGFP1 および AcGFP1-AW551984 を NIH3T3 細胞に発現させ、蛍光顕微鏡で観察を行った。AcGFP1 は核および細胞質で発現が認められた。一方、AcGFP1-AW551984 は細胞質で発現が認められた (図 1)。また、マウス ES 細胞から胚葉体を 10 日間形成させ、細胞分画を行い、AW551984 の発現をウェスタンブロットで確認した。AW551984 は、胚葉体形成による ES 細胞の分化によって発現が上昇することを、我々は既に報告している。AW551984 は細胞質基質画分での発現が認められたが、膜・オルガネラ画分、核画分、細胞骨格画分においては、その発現は認められなかった (図 2)。以上の結果より、AW551984 は主に細胞質基質に局在することが示された。

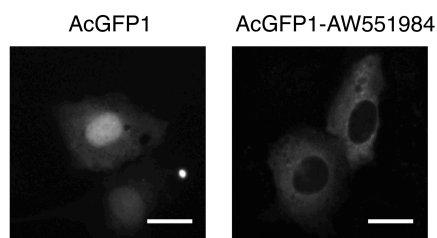


図 1 AcGFP1-AW551984 の細胞内局在

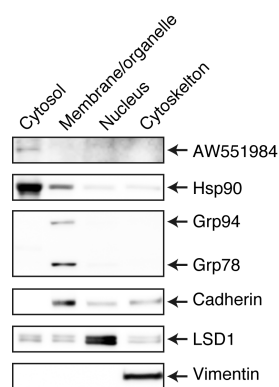


図 2 マウス ES 細胞由来胚葉体の細胞画分における AW551984 のタンパク質発現

次に、AW551984 の結合タンパク質の同定を行うため、GST-AW551984-VIT リコンビナントタンパク質を作製し、マウス胚葉体抽出液からのプルダウンを試みた。コントロールとして、GST タンパク質を用いた。GST-AW551984-VIT タンパク質を用いたプルダウンの後、SDS-PAGE による分離とゲル切り出しを行い、LC-MS/MS を用いて結合タンパク質の同定を試みた。合計 8 種類のタンパク質が、ペプチドの MASCOT 解析によって同定された。AW551984 結合タンパク質の心筋細胞分化に対する影響を検討するために、AW551984 とこれら 8 つの AW551984 結合タンパク質をエンコードする遺伝子を標的とする特異的な siRNA を、マウス ES 細胞にトランスフェクトし、ノックダウンを行った。これらの ES 細胞から胚葉体を形成させ、TNNT2 発現量および拍動数から、心筋細胞分化能を評価した。結合タンパク質 #1, 5, 6, 7, 8 において、TNNT2 発現の有意な低下が見られた (図 3)。また同様に、結合タンパク質 #1, 5, 6, 7, 8 において拍動数の割合も低下した (data not shown)。したがって、以上より結合タンパク質 #1, 5, 6, 7, 8 は、心筋細胞分化を正に制御することが示唆された。現在、これらの候補遺伝子の内、心筋細胞分化に重要な役割を果たすシグナル経路を制御することが報告されているものに絞って、解析を行っている。

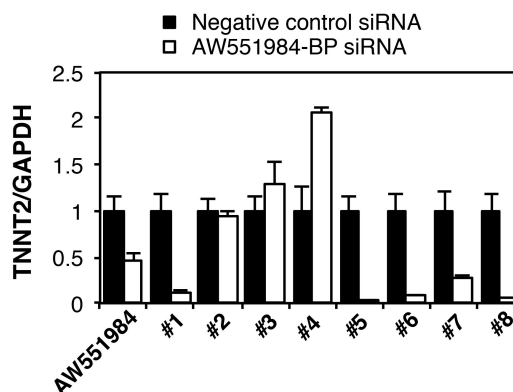


図 3 AW551984 結合タンパク質を標的とする siRNA のマウス ES 細胞由来胚葉体における TNNT2 発現量に対する影響

次に、マウス ES 細胞における AW551984 による心筋細胞分化の制御が、ヒト iPS 細胞においても同様に観察されるかを確認した。AW551984 のヒトホモログである VWA5A に対する特異的な shRNA を安定的に発現するヒト iPS 細胞を作製した。未分化状態において、多能性マーカーである NANOG および OCT3/4 の mRNA 発現には影響は見られなかった (data not shown)。ヒト iPS 細胞から胚葉体を形成させ、心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現を測定した。これらのマーカーは、コントロール shRNA 細胞に比べて、VWA5A shRNA 細胞で発現が低下していた。一方で VWA5A shRNA は、内皮細胞マーカーである CD31 の発現は低下させなかった (図 4)。これらの結果より、AW551984 ホモログはヒト多能性幹細胞においても心筋細胞分化を制御することが示唆された。

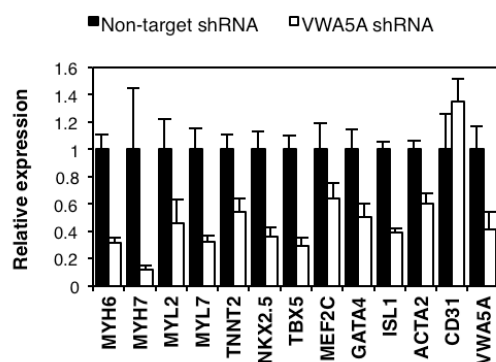


図4 VWA5A shRNA のヒト iPS 細胞由来胚葉体の心筋細胞マーカー遺伝子発現に及ぼす影響

本研究により、AW551984 の細胞内局在とその結合タンパク質が明らかになった。また、AW551984 結合タンパク質の内、マウス ES 細胞の心筋細胞分化に関与するものが示された。AW551984 のヒトホモログである VWA5A の発現抑制実験により、VWA5A がヒト iPS 細胞の心筋細胞分化に関与することを示した。今後は分化時のシグナル伝達という観点から、AW551984 とその結合タンパク質の心筋細胞分化制御の分子メカニズムを明らかにして行きたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 7 件)

- ① Kusakawa S, Yasuda S, Kuroda T, Kawamata S, Sato Y. Ultra-sensitive detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products by digital analysis of soft agar colony formation. *Sci. Rep.* 2015;5:17892.
- ② Kuroda T, Yasuda S, Matsuyama S, Tano K, Kusakawa S, Sawa Y, Kawamata S, Sato Y. Highly sensitive droplet digital PCR method for detection of residual

undifferentiated cells in cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Regen. Ther.* 2015;2:17-23.

- ③ Yasuda S, Sato Y. Tumorigenicity assessment of human cell-processed therapeutic products. *Biologicals* 2015;43(5):416-421.
- ④ Kusakawa S, Machida K, Yasuda S, Takada N, Kuroda T, Sawada R, Okura H, Tsutsumi H, Kawamata S, Sato Y. Characterization of *in vivo* tumorigenicity tests using severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2R $\gamma^{\text{null}}$  mice for detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products. *Regen Ther.* 2015;1:30-7.
- ⑤ Kono K, Takada N, Yasuda S, Sawada R, Niimi S, Matsuyama A, Sato Y. Characterization of the cell growth analysis for detection of immortal cellular impurities in human mesenchymal stem cells. *Biologicals.* 2015;43(2):146-9.
- ⑥ Tano K, Yasuda S, Kuroda T, Saito H, Umezawa A, Sato Y. A novel *in vitro* method for detecting undifferentiated human pluripotent stem cells as impurities in cell therapy products using a highly efficient culture system. *PLoS One.* 2014;9:e110496.
- ⑦ Kuroda T, Yasuda S, Sato Y. In vitro detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human induced pluripotent stem cells. *Methods Mol. Biol.* 2014;1210:183-92.

〔学会発表〕 (計 17 件)

- ① 黒田拓也, 安田智, 松山さと子, 高田のぞみ, 中島啓行, 草川森士, 梅澤明弘, 松山晃文, 川真田伸, 佐藤陽治 ヒト iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞中に混入する不死化細胞検出法の開発とその性能評価 第 15 回再生医療学会総会, 大阪 2016 年 3 月.
- ② 草川森士, 安田智, 黒田拓也, 川真田伸, 佐藤陽治 デジタル軟寒天コロニー形成試験を利用した再生医療製品の品質評価 第 15 回再生医療学会総会, 大阪 2016 年 3 月.
- ③ Kuroda T, Yasuda S, Matsuyama S, Takada N, Nakashima H, Kusakawa S, Umezawa A, Matsuyama A, Kawamata S, Sato Y. Simple *in vitro* method for detection of immortalized cells in human retinal pigment epithelial cells. World Stem Cell Summit 15, Atlanta 2015 年 12 月.
- ④ Kusakawa S, Yasuda S, Kuroda T, Kawamata S, Sato Y. Digital analysis of soft agar colony formation for highly sensitive detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed

- therapeutic products. World Stem Cell Summit 15, Atlanta 2015年12月.
- ⑤ Tsutsumi H, Kusakawa S, Sawada R, Urano K, Mizushima T, Nishinaka E, Inoue R, Yasuda S, Sato Y. Comparison of human cell engraftment and differentiation abilities among strains of immunodeficient mice with different genetic backgrounds. 51<sup>st</sup> Congress of the European Society of Toxicology, Porto 2015年9月.
- ⑥ 草川森士, 安田智, 黒田拓也, 川真田伸, 佐藤陽治 軟寒天コロニー形成試験を応用した再生医療製品に混在する悪性形質転換細胞の高感度検出法 第14回再生医療学会総会, 横浜 2015年3月.
- ⑦ 田埜慶子, 安田智, 黒田拓也, 梅澤明弘, 佐藤陽治 ヒト多能性幹細胞由来再生医療製品中に残存する未分化細胞をダイレクトに検出する方法の開発 第14回再生医療学会総会, 横浜 2015年3月.
- ⑧ 高田のぞみ, 河野健, 安田智, 澤田留美, 新見伸吾, 松山晃文, 佐藤陽治 細胞増殖特性を利用した不死化細胞検出試験法の性能評価 第14回再生医療学会総会, 横浜 2015年3月.
- ⑨ Yasuda S. The New Japanese Regulatory Framework for Regenerative Medicine & Cell Therapy. World Stem Cell Summit 14, San Antonio 2014年12月.
- ⑩ Kusakawa S, Yasuda S, Kuroda T, Kawamata S, Sato Y. A new soft agar colony formation assay based on high-content imaging for sensitive detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products. Global Controls in Stem Cells, Singapore 2014年11月.
- ⑪ Kuroda T, Tachi S, Yasuda S, Kusakawa S, Sato Y. Profiling of Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines for Predicting the Differentiation Propensity. International Society for Stem Cell Research 12<sup>th</sup> Annual Meeting, Vancouver 2014年6月.
- ⑫ Tano K, Yasuda S, Umezawa A, Sato Y. A highly efficient culture method for growth and detection of undifferentiated human pluripotent stem cells present as impurities in cell-processed therapeutic products. 20<sup>th</sup> International Society for Cellular Therapy, Paris 2014年4月.
- ⑬ 城しおり, 黒田拓也, 安田智, 草川森士, 佐藤陽治 ヒトiPS細胞の分化プロペンシティ予測のための細胞特性プロファイリング 第13回再生医療学会総会, 京都 2014年3月.
- ⑭ 田埜慶子, 安田智, 梅澤明弘, 佐藤陽治 ヒト多能性幹細胞由来再生医療製品中に混入する未分化細胞の高効率培養法の開発 第13回再生医療学会総会, 京都 2014年3月.
- ⑮ 黒田拓也, 安田智, 草川森士, 松山さと子, 川真田伸, 澤芳樹, 佐藤陽治 デジタルPCRを用いたヒトiPS細胞由来分化細胞に残存する未分化iPS細胞の高感度検出法の開発 第13回再生医療学会総会, 京都 2014年3月.
- ⑯ Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Kawamata S, Sato Y. Application of droplet digital PCR technology to detection of residual undifferentiated cells in cardiomyocytes derived from human iPS cells. World Stem Cell Summit 2013, San Diego 2013年12月.
- ⑰ Kusakawa S, Machida K, Yasuda S, Takada N, Kuroda T, Sawada R, Matsuyama A, Tsutsumi H, Kawamata S, Sato Y. Characterization of *in vivo* tumorigenicity test using severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2 $\gamma$ <sup>null</sup> mice for quality assessment of human cell-processed therapeutic products. World Stem Cell Summit 2013, San Diego 2013年12月.

〔図書〕(計2件)

- ① 安田智, 佐藤陽治 再生医療製品の品質関連規制と対応の留意点 『動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術』(編集:技術情報協会), 技術情報協会 pp. 517-22 (2014)
- ② 中島啓行, 安田智, 佐藤陽治 ヒトES/iPS細胞に由来する再生医療製品の造腫瘍性をどう見るか? 実験医学別冊, 羊土社 pp. 61-68 (2014)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 悪性形質転換細胞の検出方法  
 発明者: 草川森士, 安田智, 佐藤陽治  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2014-176861  
 出願年月日: 平成26年9月1日  
 国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等  
 多能性幹細胞安全情報サイト  
<http://www.nihs.go.jp/cbtp/sispsc/html/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 智 (YASUDA, Satoshi)  
 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 室長  
 研究者番号: 20381262