

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2015

課題番号：15H06370

研究課題名(和文) 心筋再生療法への応用を目指した新規心筋前駆細胞特異的表面マーカーの探索

研究課題名(英文) Identification of novel surface marker of cardiac progenitor cells for heart regeneration therapy

研究代表者

石田 秀和 (ISHIDA, HIDEKAZU)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教(常勤)

研究者番号：50467552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス胚における心臓前駆領域から得られた遺伝子発現の網羅的解析によって、心臓前駆細胞に特異的な細胞表面マーカーを同定した。それを用いることで、マウスのES細胞やヒトのES細胞、iPS細胞から心筋前駆細胞を単離することが可能になった。これによって将来、心不全患者に対する心筋前駆細胞を用いた再生医療につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We identified a novel cell surface marker of cardiac progenitor cells by using next generation sequencing of single cell cDNA derived from mouse embryonic heart field. We could purify the cardiac progenitor cells from mouse embryonic stem cells as well as human embryonic / induced pluripotent stem cells. This marker can be applied for the future heart regeneration therapy, such as cardiac progenitor cell transplantation therapy.

研究分野：小児循環器学

キーワード：心筋前駆細胞 次世代シーケンサー 表面マーカー

1. 研究開始当初の背景

心不全は我が国において最も重要な死因の一つであり、近年、心筋再生治療の臨床応用が注目を浴びている。心筋再生には、(1) ES 細胞や iPS 細胞由来の心筋細胞等を用いた細胞移植療法、(2) 成体心筋幹細胞を移植する方法、(3) 心筋線維芽細胞を心筋細胞に直接転換する方法、の3つが主に模索されている。しかし、いずれの方法においても、心臓初期発生において、中胚葉細胞から心筋前駆細胞/心筋細胞への運命決定の制御メカニズムや、心筋前駆細胞の細胞生物学的特性といった発生生物学的な基礎真理の解明が、より効率的で安全な心筋再生療法の発展のためには必要不可欠である。

哺乳類において、心臓原基は側板中胚葉の前方領域に由来し、一次心臓領域と二次心臓領域という異なる細胞集団で構成されている。一次心臓領域はその後の左心室と心房の一部に寄与し、二次心臓領域はその後の右心室と流出路、心房の一部に寄与する。最近我々は、一次心臓領域の心筋前駆細胞は、初めに転写因子 Tbx5 のみを発現する細胞集団として出現し、心筋細胞のみにしか分化できない細胞運命が限定された集団であることを明らかにした。しかし、心筋前駆細胞のアイデンティティの獲得、そして一次および二次心臓領域の相違を決定する分子メカニズムについては依然明らかになっていない。

この分野の進展を妨げている大きな理由の一つは、発生初期における心筋前駆細胞特異的表面マーカーが乏しい事にある。もし特異的表面抗原が同定されれば、誰もが簡単に心筋前駆細胞を認識・単離でき、心筋前駆細胞に関する理解が飛躍的に深まるだけでなく、心筋前駆細胞を用いた細胞移植療法の開発や、成体内における心筋前駆細胞の特性の解明など、さらなる臨床応用への期待も高まる。

この問題を解決すべく、我々はマウス初期胚の心臓前駆領域から細胞を一つ一つ単離し、その細胞より、個別の single cell derived cDNA ライブラリを作成した。このライブラリを用いて、心筋前駆細胞特異的な表面マーカーを探索することが可能になった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が確立した単一心筋前駆細胞由来 cDNA ライブラリから、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析を行うことで、新たな心筋前駆細胞表面マーカー候補を同定し、それに対して、マウス胚とマウス ES 細胞/ヒト iPS 細胞を用いて、心筋前駆細胞特異的表面マーカーとしての有用性・実用性を明らかにすることである。

3. 研究の方法

心筋前駆細胞由来 cDNA ライブラリに対する次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析により、特異的表面マーカー候補を同定し、以下の実験を行うことで心筋前駆細胞表面マーカーとして有用であるかを確認し、マークされる心筋前駆細胞の特性を把握する。

1. マウス 7.25-7.75 日胚を用いた Whole mount in situ hybridization により、候補遺伝子が心臓前駆領域で実際に発現しているのかどうかを確認する。発現が認められた場合、免疫組織染色を行うことで、タンパクレベルでの発現と一次/二次心臓領域特異性を検証する。

2. マウス ES 細胞とヒト iPS 細胞を用いた心筋細胞分化誘導系において、候補遺伝子の発現パターンを定量的リアルタイム PCR 法で検証するとともに、フローサイトメトリーにて、それぞれの候補タンパクが実際に表面マーカーとして機能するかどうかを確認する。

3. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)を用いて、表面マーカー陽性の細胞集団を単離・培養し、免疫細胞染色とフローサイトメトリーにて心筋細胞への分化能を検討する。

4. 研究成果

1. マウス 7.25-7.75 日胚を用いた Whole mount in situ hybridization (WISH) による発現確認と免疫組織染色による一次/二次心臓領域特異性の検討

マウス心筋前駆領域由来の single cell cDNA に対する網羅的発現プロファイリングによって得られた、心筋前駆細胞特異的表面マーカー候補 34 遺伝子について、WISH 用プローブが既報であり、かつその遺伝子がコードする表面抗原に対して、抗体が市販されているものを対象として実験を開始した。

まず CD1 マウスの 7.25-7.75 日胚を回収し、4%パラホルムアルデヒドで 4、16 時間固定し、WISH を行った。その結果 2 つの遺伝子候補が同定された (図 1)。さらに、タンパクレベルでの発現解析のため、免疫組織染色による発現パターンの解析を行ったところ、Tbx5 (一次心臓領域)、Hcn4 (一次心臓領域)、Isl1 (二次心臓領域)、Nkx2-5 (両心臓領域) と共染し、候補遺伝子がコードするタンパク質が一次、二次心臓領域の両方で発現していることが明らかとなった。さらに、この遺伝子は、原始心筒がルーピングし、心筋細胞が自己拍動を始める E9.5-10.5 のステージでは、発現が消失しており、心筋前駆細胞に特異的に発現していることが判明した。

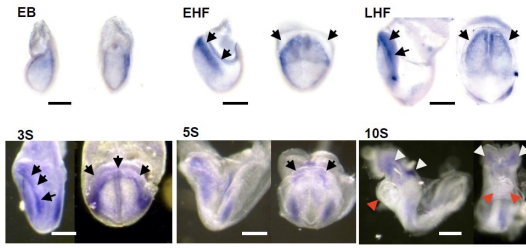


図1. 候補遺伝子に対する Whole mount in situ hybridization.

心臓前駆領域である cardiac crescent で発現が認められ、heart tube では発現が低下している。

2. マウス ES 細胞とヒト iPS 細胞を用いた心筋分化誘導系における発現解析

次に、候補となる心筋前駆細胞表面マーカーが、マウスあるいはヒトの多能性幹細胞から心筋細胞を分化誘導する過程において心筋前駆細胞で発現しているかを検討した。マウス ES 細胞とヒト iPS 細胞を心筋細胞に分化誘導する系については、既報の方法(3)(4)に従って行った。我々の研究室においては、マウス ES 細胞は分化誘導開始 8 日目から、ヒト iPS 細胞は 9-10 日目から自己拍動する心筋細胞へと分化することが確認できた。

まず、心筋細胞へと分化する ES/iPS 細胞から経時的に RNA を採取し、定量的リアルタイム PCR 法によって、表面マーカー候補遺伝子の発現パターンを解析したところ、候補遺伝子が心筋細胞へ分化し、自己拍動を開始する直前に、一過性に高い発現を示すことが明らかになった(図2)。これに加えて、フローサイトメトリーを用いて、表面マーカー候補タンパクの発現パターンを経時的に観察したところ、同時期にタンパクレベルでも、一過性に発現が認められ、同時に FACS を用いて、この候補タンパク陽性の細胞を収集できることが示唆された。

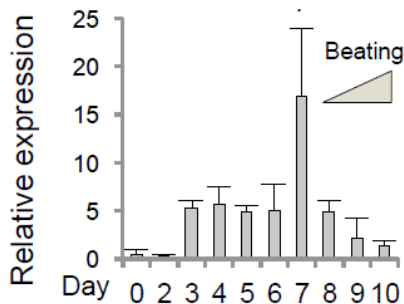


図2. 候補遺伝子に対する定量的リアルタイム PCR

分化中に ES 細胞が自己拍動を開始する直前の心筋前駆細胞において、一過性の発現上昇を認める。

3. FACS による心筋前駆細胞の単離と心筋細胞への分化能の解析

フローサイトメトリーにて、表面マーカー候補タンパクの発現が確認できたため、次に FACS によって候補タンパクの陽性細胞を収集した。収集した表面マーカー陽性細胞は、そのまま心筋細胞分化誘導メディウムとともに 0.1%ゼラチンコートした細胞培養ディッシュに播種し in vitro での培養を続けた。培養 5 日目に一部の細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、心筋トロポニン T(cTnT)に対する免疫細胞染色を行ったところ、ほとんどすべての細胞が心筋細胞へと分化していることが判明した。これにより、候補表面マーカー陽性細胞がすでに心筋細胞系統へとコミットした集団であることが示唆された(図3)。

本研究により、新規の心筋前駆細胞特異的表面マーカーとして実用性のある表面マーカーをスクリーニングし、同定することができた。この有望な表面マーカーは、心筋細胞分化における機能解析や、心不全モデル動物に対する心筋前駆細胞を用いた心筋再生療法への応用等、今後さらなる発生生物学的基礎研究の発展と臨床応用への道が期待できる

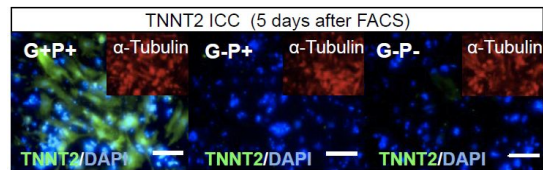
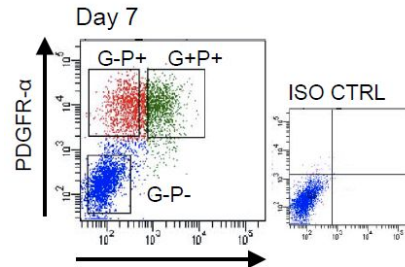


図3. 候補マーカーに対する抗体を用いた FACS と心筋トロポニン T に対する免疫細胞染色

分化誘導 7 日目に FACS で収集した心筋前駆細胞は、その後、効率的に心筋細胞へと分化する。

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

石田 秀和、 Identification and

characterisation of a novel cell surface marker of cardiac progenitor/precursor cells. 日本小児循環器学会総会 2015/7/18 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 秀和 (ISHIDA HIDEKAZU)
大阪大学大学院医学系研究科小児科学
特任助教

研究者番号：50467522

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：