

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15441

研究課題名(和文)新しい心筋細胞の形質同調機構の解明と心臓再生への応用

研究課題名(英文)Elucidation of novel mechanism of phenotype synchronization among cardiomyocytes

研究代表者

山下 潤 (Yamashita, Jun)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：50335288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の分化を同期させ細胞形質を同調させるメカニズムが生体に存在することが推定されるが、その分子機構は不明であった。研究代表者は最近、幹細胞分化速度を恣意的に制御することを初めて可能にし(Cell Stem Cell, 2012)、同手法を用いて分化速度の異なる細胞群が同調して分化することを見いだした。心筋細胞分化においても分化同調現象が認められる。こうした細胞形質同調の分子機構を明らかにし、同調現象を制御可能とする。心筋細胞の形質同調制御による新しい心臓再生戦略を開発する。この分化同調性制御になっているのはExosomeであることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Previously, we succeeded in manipulating the velocity of cell differentiation from pluripotent stem cells. Recently, we found that differentiation velocity can be synchronized through unknown cell-cell communication mechanisms. In this study, we demonstrated that exosome secreted from the cells mediates the differentiation synchronizing phenomenon.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：細胞・組織 発生・分化 シグナル伝達 循環器・高血圧 再生医学

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、多能性幹細胞からの心血管細胞の分化再生に関する広範な研究と技術開発を行ってきた (Nature, 2000; Circulation, 2008; Blood, 2009, 2011; J Cell Biol, 2010 ほか)。その中で最近、PKA (protein kinase A)の活性が、多能性幹細胞の初期分化のスピードを制御していることを見だし、幹細胞分化速度を恣意的に制御することを初めて可能にした (Cell Stem Cell, 2012)。同技術を用いて分化速度の異なる細胞を共存させながら分化させたところ、分化の遅い細胞が早い細胞に同調して同じタイミングで分化することを見だし (分化速度同調性)。さらにその同調において、Gap junction 及び Exosome を介した情報伝達機構の関与を見だしている。この新発見をもとに新しい「細胞形質の同調性制御機構」の存在を明らかにし、分子レベルでの機構解析を行うことにより、細胞分化再生機構を新たな切り口で理解し直し、新たな心臓再生戦略を開拓することができると考えられた。

幹細胞分化の同調性解析システムは今回研究代表者が新たに発見し開発したオリジナルのものであり、類似の研究は存在しない。心筋分化に関しては microRNA や Gap junction の関与を示唆するものはあるが (Hosoda, Front Genet, 2013; Srivastava, Biomed Res Int, 2013)、細胞形質の同調機構という生命現象の一つとしての概念へと広がるには至っていない。Exosome に関しては最近がん転移を始め様々な生命現象において細胞間情報伝達の機能が注目されて来ているが、細胞分化や形質の同調性制御に働いているという視点はまだない。本研究は、1) 多能性幹細胞からの心血管細胞の系統的誘導、2) CRISPR-Cas9 を用いた簡便な遺伝子機能解析系 (Biochem Biophys Res Commun, 2014; 年間 1000-1500 論文中ダウンロード件数第 5 位)、3) ゼラチンハイドロゲルによる簡便な細胞シート多重積層化 (Sci Rep, 2015) など数々の研究代表者の独自の新技术・ノウハウを駆使して細胞形質の同調性制御システムを包括的に解析するものであり、技術的先進性も非常に高い最先端研究である。

発生の過程において、個々の細胞の分化の方向性やタイミング、速度等はうまく同調し、求められる発生過程から逸脱しないように進行する。液性因子の拡散という従来の分化シグナルだけでこうした分化の同調性は説明が付きにくい。実際液性因子を投与する形の多能性幹細胞からの分化誘導では個々の細胞の分化段階にしばしば多様性が生まれる。すなわち、細胞分化においては、分化誘導とともに分化を同調させる機構の存在が示唆されるが、その分子実体は全く不明である。こうした細胞の分化段階・細胞形質の同調性制御は、発生過程以外にも認められてい

る。例えば種々の幹/前駆細胞の心筋細胞への分化において、分化した心筋細胞と共培養すると心筋細胞への分化が促進されることが知られているが、その機構も全く不明である。このように細胞の分化を同期させ、ある集団の細胞形質を同調させるメカニズムが生体には存在するはずであるが、その分子機構は長らく不明であった。

本研究は、研究代表者らが世界で初めて構築した分化同調性制御を検出・検討できる実験系を用いて、この生物学上の謎に挑戦し、さらにそこで得られた知見をもとに新たな心臓再生治療戦略を模索するものであり、新規性独創性は著しく高い。

2. 研究の目的

本研究では、細胞形質の同調性制御が関与する 2 つの生命現象に関して、分子実体を明らかにするとともに、同調性制御による新しい細胞分化の理解と治療戦略開発を目指す。

(1) 分化速度同調性: 「同調性の基本モデル」

(2) 心筋による心筋分化誘導: 「同調性の付与」

(1) において分化同調性制御機構を明らかにし、(2) で心筋分化における同機構の関与と同機構の制御を可能とする。これら知見を用いて、

(3) 形質同調性制御の心臓再生への応用を行う。In vitro, in vivo における心筋同調性分化システムを構築し、新しい心臓再生治療戦略を開発する。

研究期間内においては、(1)(2) の機構を明らかにし、(3) を開始することを目指す。

3. 研究の方法

【分化同調性解析システム】薬剤誘導性活性化型 PKA 発現細胞 (PKA-ES 細胞) を用いて、分化誘導時に PKA を活性化させることにより FIK1 陽性細胞など三胚葉細胞の出現を約 2 倍早くすることが可能となった。そこで、この PKA-ES 細胞と通常の GFP 発現 ES 細胞 (GFP-ES 細胞) を共培養しながら分化誘導し、テトラサイクリン (Dox) により PKA-ES 細胞でのみ PKA を活性化し分化速度を速くすることにより、分化速度が異なる細胞群が共存する系を構築した。その結果、

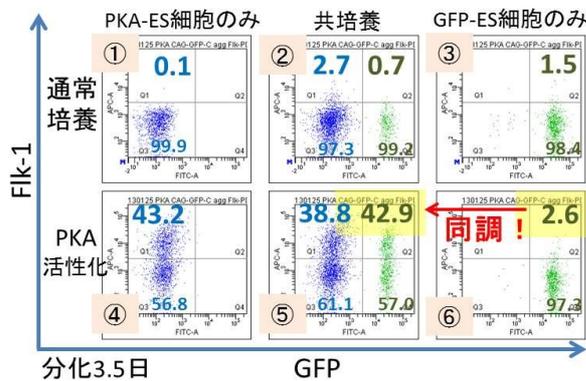
i) PKA-ES 細胞及び GFP-ES 細胞を単独で分化誘導 (通常分化誘導): 分化 3.5 日では FIK1 陽性細胞はわずかしかない (パネル)

ii) 共培養し通常分化: 分化はわずか (パネル)

iii) 単独で分化して PKA 活性化: PKA-ES 細胞では多数の FIK1 陽性細胞が出現 (パネル)、GFP-ES 細胞では Dox に反応なし (パネ

ル)

iv) 共培養し PKA 活性化:GFP-ES 細胞の Flk1 陽性細胞が増加! (パネル) (下図)



(1) 同調性制御機構の分子実体の解明

i)細胞間 direct contact を介したシグナル伝達 (おもに Gap junction の関与)

PKA-ES 細胞と GFP-ES 細胞の共培養実験において、カルチャーインサートなどを用いて両細胞の直接接触を阻害して培養した場合には、同調作用は小さくなった。同結果より、両細胞の直接接触が重要と考えられる。そこで gap junction の意義と役割を解析する。

同調作用に關与する connexin isoform の同定: gap junction は connexin の 6 量体からなる。同調作用を担っている connexin isoform を同定する。RNAi による阻害及び代表者らが開発した CRISPR-Cas9 を用いた簡便な遺伝子機能解析システム(図 2)を用いて、機能阻害及び機能回復を確認する。

Gap junction を介して伝達される物質の同定: PKA-ES 細胞の PKA 活性化あり・なし、GFP-ES 細胞の PKA-ES 細胞との共培養ある・なしでそれぞれ細胞を純化し、microRNA ほか small RNA を網羅的に比較する。その他これら細胞において増減するタンパクについても網羅的に解析する。

ii)Exosome を介した情報伝達

Exosome は直径 30-100nm の脂質 2 重膜小胞である。細胞から放出され、唾液、血液、尿など体液中に安定して観察される。様々なタンパクや RNA などが含まれ細胞間情報伝達の新たな機構として近年注目されている。

同調作用における Exosome の関与:上記 i)-と同様に、RNAi 及び遺伝子解析システムを用いて分子レベルでの機能確認を行う。単離 Exosome により分化促進作用を再現する。

Exosome を介して伝達される物質の同定: PKA-ES 細胞の PKA 活性化あり・なしで Exosome を純化し、内容物の網羅的比較検討を行う。small RNA の網羅的比較。differential MS を用いて発現量の異なるタンパクを網羅的に同定。

これらの検討により、同調性制御を担っている分子実体を明らかにする。

(2) 同調性の付与による心筋分化・再生 心筋分化同調作用の分子機構を明らかにし、幹細胞分化の心筋細胞へ分化同調性を付与することにより、心臓再生、すなわち破綻した恒常性の再生を試みる。

i)心筋分化運命同調の分子機構の解析 種々の心筋系列細胞共培養系の構築/心筋分化同調に關与する分子の同定

ii)同調性制御の心臓再生への応用 in vitro 心臓形成モデルによる心臓再生作用検討/新規心臓再生戦略の in vivo における検討

効率のかつ高品質・高均質な心筋を用いた新たな心臓再生戦略を開発

4 . 研究成果

(1) 同調性制御機構の分子実体の解明

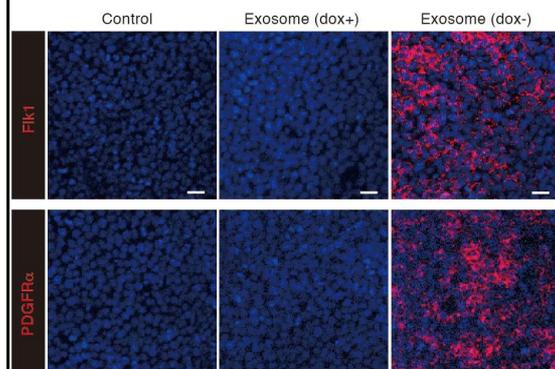
i) 細胞間 direct contact を介したシグナル伝達 (おもに Gap junction の関与) 同調作用に關与する connexin isoform の同定/Gap junction を介して伝達される物質の同定

ii) Exosome を介した情報伝達 同調作用における Exosome の関与/Exosome を介して伝達される物質の同定

3 . に示した細胞分化同調性解析システムを用いて同調作用のメカニズムを解析した

i) Gap junction の関与に関しては、ES 細胞において発現が認められる Connexin (Gap junction を形成する分子)のうち、43 及び 45 の発現を RNA 干渉により抑制する実験を行ったが、同調作用への影響は明らかではなかった。

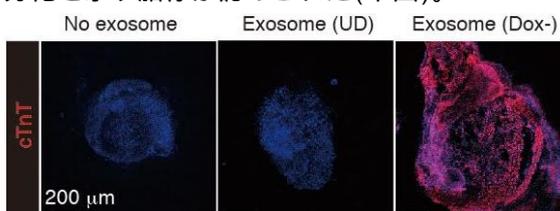
ii)一方、Exosome の合成酵素である neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)の阻害剤を添加すると、分化同調が阻害された。一方、Dox-条件で分化を促進している PKA-ES 細胞由来の Exosome を GFP-ES 細胞に投与すると、GFP-ES 細胞の分化が促進された(下図)。



ES 細胞由来エクソソームによる分化促進
dox- (PKA 活性化)ES 細胞由来エクソソーム
により中胚葉分化が促進された(赤)

以上の結果より、細胞分化同調作用を担っているのは、Exosome であることが明らかとなった。

(2) 同調性の付与による心筋分化・再生
(1)の結果より、PKA-ES 細胞由来 Exosome の心筋分化における効果を検討した。Whole mount のマウス胎仔 ex vivo 培養において、PKA-ES 細胞由来 Exosome を投与したところ、通常の培養に比し明らかに心筋細胞優位の分化を示す胎仔が認められた(下図)。



ES 細胞由来エクソソームによる in vivo 分化促進(Whole embryo 培養)
dox- (PKA 活性化)ES 細胞由来エクソソームにより心筋細胞分化が促進された(赤)

同結果により、Exosome による細胞分化同調作用により、心筋分化を促進できる可能性が示された。

以上の結果より、本研究の鍵となる重要事項
2つ、すなわち

- ・細胞分化同調作用をもたらす実体は Exosome であることを明らかにした。
- ・分化同調をもたらす Exosome を利用することにより、心筋細胞分化を誘導できる可能性が示された。

したがって、本研究はほぼ当初計画通りの進捗を示したと考えられる。

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)

皆川朋皓, 山下 潤「Exosome を介した細胞間分化同調機構」第3回日本細胞外小胞学会 **若手奨励賞**受賞

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 山下 潤 (Jun Yamashita)
京都大学 iPS 細胞研究所 教授
研究者番号: 50335288

(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 ()