

機関番号：27101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23618009

研究課題名(和文) 心筋前駆細胞のトランスクリプトーム解析による分化転換RNA分子の探索

研究課題名(英文) Transcriptome analysis of cardiac progenitors to identify small RNAs that induce transdifferentiation

研究代表者

日高 京子 (HIDAKA, KYOKO)

北九州市立大学・基盤教育センター・教授

研究者番号：00216681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：心筋細胞は終末分化細胞であり、心臓の再生能力には限りがある。近年、転写因子の導入により、繊維芽細胞を直接心筋様細胞にリプログラミングするという報告がなされているが、その効率はまだ低い。一方、低分子RNAであるマイクロRNA(miRNA)も、遺伝子発現を制御することによって細胞の分化運命を変更できるのではないかと注目されている。今回我々は、マウスES細胞由来細胞を用いて、心筋前駆細胞で発現するmiRNAを同定した。さらに、心臓繊維芽細胞にこれらのmiRNAを組み合わせて導入することによって、心筋の遺伝子を誘導することができた。以上の知見は、心臓再生のための新たな治療法の開発につながると思われる。

研究成果の概要(英文)：In mammalian heart, cardiac muscle cells (cardiomyocytes) are terminally differentiated and their regenerative capacity is limited. Recent studies have demonstrated that a combination of transcription factors could reprogram fibroblast directly to cardiomyocyte-like cells, albeit at a low efficiency. On the other hand, microRNAs (miRNAs), a family of small RNAs, have also been shown to convert cell fate by regulating gene expression. Here, we identified miRNAs that were expressed in cardiac progenitor cells, by transcriptome analysis of murine ES cell-derived cells. We also found that a combination of these miRNAs could induce myocyte-specific genes in cardiac fibroblasts. These findings may improve direct reprogramming methods towards regenerative cardiac therapy.

研究分野：再生医学・医療

科研費の分科・細目：再生医学・医療

キーワード：miRNA 分化転換 心筋細胞 多能性幹細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む哺乳類の心筋細胞は生後間もなく分裂を停止し、傷ついた心臓はほとんど再生することができない。心臓を再生させる方法として、ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞由来の心筋細胞を移植する方法が考えられるが、移植細胞を心筋として機能させることは難しく、細胞数の問題や移植方法など、解決しなければならない問題は多い。

これに対して、心臓に豊富に存在する心臓繊維芽細胞を直接リプログラミングして、心筋細胞に分化転換しようという試みが始まっている(文献)。Srivastavaらのグループは転写因子 Gata4、Mef2c、Tbx5 の導入により、Olsonらのグループは上記に加え Hand2 の導入により、心臓繊維芽細胞から心筋への誘導を *in vitro* および *in vivo* で報告している。しかしながら、分化転換により繊維芽細胞が成熟した心筋細胞になる効率は低く、さらなる改良が必要である。

近年、生体内にはマイクロRNA(miRNA)と呼ばれる小分子RNAが存在し、それぞれ標的となる遺伝子の発現制御を通して、細胞の増殖や分化制御など、多くの場面で重要な役割を果たしていることがわかってきた。miRNAは低分子であるため細胞に導入される効率も比較的高く、miRNAによるリプログラミングについては、未分化細胞への初期化をはじめ、いくつかの細胞系での報告が相次いでおり、この方面における研究は急速に進歩している。このようなことから、心臓においてもmiRNAの導入による分化転換が十分可能であると思われる。

2. 研究の目的

本研究では、分化転換にかかわるような小分子RNA(miRNA)を探索し、繊維芽細胞から心筋細胞への分化転換を試みる。我々はこれまでマウスES細胞を用いて、心筋前駆細胞を効率よく取り出す系を開発してきた。これを細胞ソースとして用い、心筋細胞の分化初期の制御に関わり、かつ分化転換を可能とするようなmiRNA分子を探索する。

本研究開始後、Jayawardenaらが、同様な試みに関しての研究成果を報告した(文献)。これによれば、彼らは4種のmiRNA分子(miR-1、miR-133a、miR-208、miR-499)を心臓繊維芽細胞にトランスフェクションすることにより、心筋関連の遺伝子発現の上昇および、心筋特異的収縮タンパク質やチャネルの発現を観察した。しかしながら、遺伝子発現の誘導の上昇率は低く、新たなmiRNA群の組み合わせを検討するなど、改良の余地が残されていると考えられる。

そこで、本研究ではJayawardenaらによるmiRNAによる繊維芽細胞の分化転換実験の再

現を試みつつ、今回、心筋前駆細胞より新たに探索したmiRNA分子による分化誘導効果と比較検討することとした。

3. 研究の方法

(1) マウスES細胞から心筋細胞の分化誘導。マウスES細胞(ht7株)の分化誘導は胚葉体形成によって行った。まずは少量の血清入り培地で細胞塊を形成させた後、2日目に培地を追加し8日目まで浮遊培養を行った。4日目～8日目の間、血清を抜いたサンプルと、血清存在下で培養した2通りのサンプルを準備した。8日目以降、すべての胚葉体が自動拍動していることを確認した。

(2) マイクロアレイおよびqRT-PCRによる発現解析。マイクロアレイ用のサンプルはCELL INNOVATOR社に委託し、Agilent社チップにてmRNAおよびmiRNAについての解析を並行して行った。mRNAのqRT-PCRについては、GAPDHを内在性のコントロールとして、リアルタイムPCRによる解析を行った。miRNAのqRT-PCRについてはコスモバイオ社に委託し、Exiqon社のLNA™(Locked Nucleic Acid)を用いた方法で解析を行った。

(3) 繊維芽細胞およびトランスフェクション。心臓繊維芽細胞は、マウス胎児心臓由来の細胞を樹立したもので、以前発現解析を行った細胞を用いた(未発表および文献)。この細胞は10%血清存在下、DMEM培地にて安定に維持されている。miRNA導入は検討の結果、Lipofectamine RNAiMAX(Invitrogen社)で行い、蛍光ラベルしたsiRNAにて最適条件を検討した。トランスフェクション後の培養条件はJayawardenaらの方法に従い、2日目でJAK inhibitorを添加し、6日目または7日目で回収および解析を行った(図1)。



図1 分化転換実験の手順

4. 研究成果

(1) 心筋前駆細胞の発現解析。我々はこれまでにマウスES細胞より胚葉体を作らせる *in vitro* 分化系において、一時的に血清を除去することによって心筋細胞の割合が増えることを見出してきた(文献)。また、誘導後6日目では心筋または平滑筋の二方向に分化する前駆細胞が胚葉体中に存在することも見出している(文献)。そこで、本研究では分化誘導後4日目(d4)、6日目・血清あり(d6)、6日目・血清なし(d6SF)、8日目・血清あり(d8)、8日目・血清なし(d8SF)の合計5種類のサンプルを準備し、DNAマイクロアレイにてそれぞれに発現するmRNAおよびmiRNAについての解析を行った(図2)。

その結果、文献で報告した通り、血清除去条件では筋筋特異的遺伝子が強く発現する傾向が確認できた。

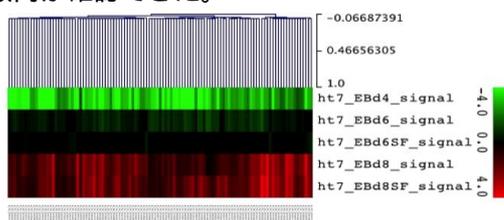


図2 胚葉体における mRNA の網羅的解析

(2) 候補 miRNA 分子の選出。(1)で得られた結果を元に、同サンプルにおいて心筋 mRNA と同様なパターンを示す miRNA の選出を行った。miRNA の発現量は全体として低かったため、なるべく多くの候補を捕まえるため、d4, d6, d8 となるにつれて発現が上昇傾向にある、d6 と d8 では血清除去によって発現が低下しない、これらの条件を満たすような miRNA を選出した。選出した miRNA (論文未発表のため X1-X5 と表示) については qRT-PCR にて発現を確認した (図3)

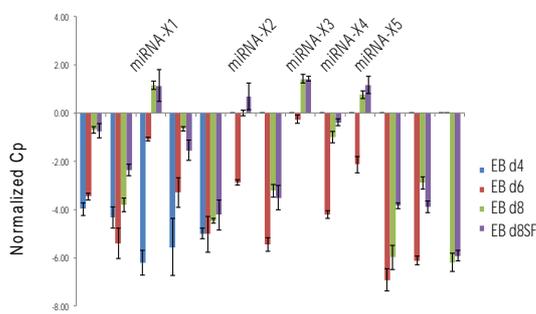


図3 胚様体における miRNA の発現解析

(3) 分化転換に用いる繊維芽細胞の検討。Jayawardena らは初代心臓繊維芽細胞を用いて分化転換実験を行っており、心臓幹細胞が用いた細胞に含まれていないことをマーカーで確認している。しかしながら、この方法では心筋前駆細胞 (あるいは操作によって一時的に脱分化した細胞) を除くことは難しいと考えられる。そこで本研究では前駆細胞が混入しないような細胞として、株化した心臓繊維芽細胞を用いることとした。細胞の形状は継代を繰り返しても安定しており、初代培養に比べるとその形状においてのばらつきが少なく均一であった (図4)

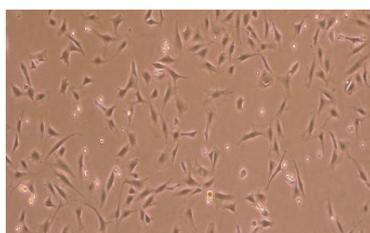


図4 分化転換実験に使用した心臓繊維芽細胞

(4) 網羅的発現遺伝子解析による miRNA 導入効果の検討。上記の心臓繊維芽細胞に対し、Jayawardena らの miRNAs (miRNAs-J4 と呼ぶ) および、今回我々が選出した5種の miRNAs (miRNAs-H5 と呼ぶ) のトランスフェクションを行った。導入後、1週間目まで培養し観察を行ったが、自動拍動など、心筋分化が進んだ指標となるものは観察されなかった。次に、遺伝子発現を包括的に調べるため、マイクロアレイを用いた mRNA 発現解析を行った。Negative control (miRNA-Nega) の導入と比較して、発現変動のあったそれぞれ約 300 の遺伝子について GO (遺伝子オントロジー) 解析 (DAVID, <http://david.abcc.ncifcrf.gov>) を行った。miRNAs-H5 と miRNA-Nega 導入細胞を比較した場合、変動した遺伝子で “regulation of heart contraction” に分類される遺伝子の頻度は 1.53% であり (P 値 4.65E-05)、miRNAs-J4 と miRNA-Nega の比較では 1.76% であった (P 値 2.30E-05)。以上のように、どちらの miRNAs によっても心臓関連の遺伝子が有意に高い割合で変動していることがわかった。

(5) 心筋への分化誘導の qRT-PCR による確認。変動のあった遺伝子のいくつかについては、qRT-PCR にて発現の変化を確認した。その結果、図に示すように、miRNA-Nega の導入よりも、miRNAs-J4 または miRNAs-H5 を導入した場合の方が、トロポミオシン遺伝子およびミオシン重鎖遺伝子が強く誘導されていることがわかった (図5)

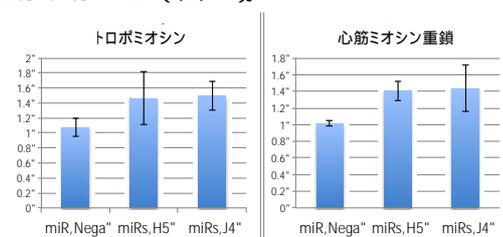


図5 miRNA 導入後の繊維芽細胞における心筋関連遺伝子の発現

(6) 考察および今後の展望。以上のことから、マウス胚様体を出発材料とし、心筋前駆細胞で発現する miRNAs を見出し、これらを組み合わせることで導入することにより、心臓繊維芽細胞に心筋遺伝子の発現をわずかながらではあるが誘導できることがわかった。また、先行研究である Jayawardena らによる報告についても、一部ながら再現できることがわかった。本研究では株化した心臓繊維芽細胞を用いたが、前駆細胞や脱分化した細胞を排除した条件で誘導を観察できたことは意義深いと思われる。

彼らの見出した4種の miRNAs と我々の見出した5種の miRNAs は一部重複があるものの、異なった組成の miRNA 混合物であり、それぞれの標的遺伝子群は異なっている。しか

しながらどちらによっても繊維芽細胞から心筋細胞への分化誘導が起こりうるということは、分化転換の道筋が複数であることを示唆している。今後は、さらに miRNA の組み合わせ方を検討することにより、効率の高い分化転換法の確立を目指す予定である。

(7) 項目 1-4 における参考文献。

- Addis RC and Epstein JA. Induced regeneration--the progress and promise of direct reprogramming for heart repair. *Nat Med.* Vol.119, No.7, 2013, pp.829-836.
- Jayawardena TM et al. MicroRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ Res.* Vol.110, No.11, 2012, pp.1465-73
- Terami H et al. Efficient capture of cardiogenesis-associated genes expressed in ES cells. *Biochem Biophys Res Commun.* Vol.355, No.1, 2007, pp.47-53
- Hidaka K et al. The cellular prion protein identifies bipotential cardiomyogenic progenitors. *Circ Res.* Vol.106, No.1, 2010, pp.111-9.

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4件)

Mochizuki S, Kanegae N, Nishina K, Kamikawa Y, Koiwai K, Masunaga H, Sakurai K. The role of the helper lipid dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) for DNA transfection cooperating with a cationic lipid bearing ethylenediamine. *Biochim Biophys Acta.* (査読有) Vol.1828, No.2, 2013, pp.412-418, DOI: 10.1016/j.bbmem.2012.10.017.

Nakazawa K, Yoshiura Y, Koga H, Sakai Y. Characterization of mouse embryoid bodies cultured on microwell chips with different well sizes. *J Biosci Bioeng.* (査読有) Vol.116, No.5, 2013, pp.628-633, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.05.005.

Fujii H, Ikeuchi Y, Kurata Y, Ikeda N et al. (Hidaka K, 13 番目/員数 18) Electro-physiological properties of prion-positive cardiac progenitors derived from murine embryonic stem cells. *Circ J.* (査読有) Vol.76, No12, 2012, pp.2875-2883, DOI:10.1253/circj.CJ-12-0126.

Sakai Y, Yoshiura Y, Nakazawa K. Embryoid body culture of mouse embryonic stem cells using microwell and micropatterned chips. *J Biosci Bioeng.* (査読有) Vol.111, No.1, 2011, pp.85-91, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2010.08.014.

[学会発表](計5件)

日高京子、中津可道、荒井勇二、森崎隆幸、續輝久、マイクロ RNA による心臓繊維芽細胞の心筋様細胞への分化誘導、第 5 回 Molecular Cardiovascular Conference II、2014 年 9 月 5 日～6 日、神戸ベイシェラトン&タワーズ(神戸市)

本多賢彦、日高京子、須川涼、深田宗一郎、住江訓明、森崎隆幸、マウス成体の骨格筋線維組成構築における Vgll2 の機能、第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 3 日～6 日、神戸ポートアイランド(神戸市)

本多賢彦、日高京子、須川涼、深田宗一郎、住江訓明、森崎隆幸、Vgll2 は成体骨格筋線維型を制御する、第 35 回日本分子生物学会、2012 年 12 月 11 日～14 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡市)

日高京子、金東浩、白井学、森崎隆幸、筋分化にかかわる RNA 結合タンパク質 Rbm24 の機能解析、第 3 回 Molecular Cardiovascular Conference II、2012 年 9 月 7 日～9 日、キロロ・ホテルピアノ(余市郡)

本多賢彦、日高京子、須川涼、深田宗一郎、住江訓明、森崎隆幸、Vgll2 regulates myosin expression and affects muscle performance. 第 34 回日本分子生物学会 2011 年 12 月 13 日～16 日、パシフィコ横浜(横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日高京子(HIDAKA, Kyoko)
北九州市立大学・基盤教育センター・教授
研究者番号: 00216681

(2) 連携研究者

中澤 浩二(NAKAZAWA, Koji)
北九州市立大学・国際環境工学部・教授
研究者番号: 00304733

櫻井 和朗(SAKURAI, Kazuo)
北九州市立大学・国際環境工学部・教授
研究者番号: 70343431