

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月2日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790116

研究課題名（和文）マウス胚性幹細胞の分化指向性における脂質シグナリングの役割の解明

研究課題名（英文）Studies on lipid signals associated with differentiation propensity in mouse ES cells

研究代表者

安田 智（YASUDA SATOSHI）

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医薬部・室長

研究者番号：20381262

研究成果の概要（和文）：細胞治療薬開発を目的とした心筋細胞の効率良い発生・増殖のためには、多能性幹細胞からの心筋分化メカニズムを理解することが必要である。心筋分化における特性が異なる P19CL6 細胞サブラインを単離し、トランスクリプトーム解析により心筋分化に関連する 24 遺伝子（CMR 遺伝子）を抽出した。マウス胚性癌細胞（EC 細胞）において RNAi により CMR 遺伝子をノックダウンし、心筋細胞に分化させたところ、18 の CMR 遺伝子で自発的拍動もしくは心筋特異的マーカー遺伝子発現量に影響が見られた。マウス胚性幹細胞（ES 細胞）においても検討したところ、AW551984、prostamide/prostaglandin F synthase、Cd302 のノックダウンによって、EC 細胞と ES 細胞に共通して心筋分化の程度に変化が観察された。AW551984 のノックダウンは、多能性および中胚葉への分化に影響を及ぼすことなく、心筋特異的転写因子である Nkx2.5 の発現を抑制した。さらに、Wnt/ β -catenin シグナルは胚葉体形成時における AW551984 と Nkx2.5 の発現を増強した。これらのことから、AW551984 は Wnt/ β -catenin シグナルによる Nkx2.5 発現を調節することにより、心筋分化を制御することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：An understanding of the mechanism that regulates the cardiac differentiation of pluripotent stem cells is necessary for the effective generation and expansion of cardiomyocytes as cell therapy products. We isolated P19CL6 cell sublines that possess distinct properties in cardiomyogenesis and extracted 24 cardiomyogenesis-related candidate (CMR) genes correlated with cardiomyogenesis using a transcriptome analysis. Knockdown of the CMR genes by RNAi revealed that 18 CMR genes influence spontaneous contraction or transcript levels of cardiac marker genes in embryonal carcinoma (EC) cells. We also performed knockdown of the CMR genes in mouse embryonic stem (ES) cells and induced in vitro cardiac differentiation. Three CMR genes, AW551984, Prostamide/prostaglandin F synthase and Cd302, modulated the cardiac differentiation of both EC cells and ES cells. Depletion of AW551984 attenuated the expression of early cardiac transcription factor Nkx2.5 without affecting transcript levels of pluripotency and early mesoderm marker genes during ES cell differentiation. Activation of Wnt/ β -catenin signaling enhanced the expression of both AW551984 and Nkx2.5 in ES cells during embryoid body formation. Our findings indicate that AW551984 is a novel regulator of cardiomyogenesis from pluripotent embryonic cells, which links Wnt/ β -catenin signaling to Nkx2.5 expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	0	3,400,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：発生生物学

1. 研究開始当初の背景

胚性幹細胞 (ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) といった多能性幹細胞は、内・中・外胚葉に分化することができる多能性と、半永久的に増殖できる自己増殖能を合わせ持つ細胞である。体性幹細胞と異なり量的な制限を考慮する必要がないため、ES 細胞や iPS 細胞を目的の細胞に分化させ、再生医療における細胞治療薬として用いる試みがされている。また、目的細胞への低い分化効率や収量の低下を招くため、効率の高い分化方法を考案することが重要である。心筋細胞に関して述べると、*in vitro* で ES 細胞や iPS 細胞を心筋細胞に分化するには、未分化状態を保つために添加されている leukemia inhibitory factor (LIF; マウス) や basic FGF (ヒト) を除いた培地で、三次元培養にて胚様体 (embryoid body) を形成させる必要がある。この過程において、細胞の一部は中胚葉、心筋前駆細胞を経て心筋細胞に分化する。近年、Wnt や BMP アンタゴニストである Noggin を一時的に培地に添加することにより、マウス ES 細胞から心筋細胞への分化効率を上昇させることが報告されている。しかしながら、これらの因子の添加のみでは心筋細胞への分化効率は不十分であり、さらに分化効率を上昇させる因子を探索する必要があると考えられる。

脂質は細胞膜の構成成分やエネルギー源としての役割だけでなく、受容体のリガンドや細胞内シグナル伝達におけるセカンドメッセンジャーとしても重要な役割を果たしている。しかしながら再生医療における細胞治療薬の作製に関して、脂質シグナリングの応用は全くされていない。ES 細胞から心筋細胞分化に関与する脂質、脂質代謝酵素および脂質受容体を同定することができれば、心筋細胞への効率的な分化につながる可能性がある。

2. 研究の目的

ヒト ES 細胞において、どの系譜の細胞に分化し易いかが株によって著しく異なることが報告されている。我々はマウス ES 細胞においても、株間で心筋細胞への分化効率が異なることを見出している。このような株間の特定の系譜の細胞への分化における指向性の違いを利用し、分化効率に影響する因子を探索する。心筋分化効率の異なるマウス胚性癌細胞 (EC 細胞) 株もしくは ES 細胞株を用いて、心筋分化能と発現量が相関を示す遺伝子を網羅的に検索した後、同定された遺伝子群が心筋細胞分化に影響を及ぼすかを、RNAi による遺伝子発現の抑制実験などで検討する。また脂質代謝に関連する遺伝子が同定された場合は、遺伝子の機能から予想され

る脂質リガンドや代謝産物の分化効率への影響も検討する。最終的には、心筋細胞分化の制御を行う脂質関連因子の同定およびそれらの制御機構を明らかにしたい。

3. 研究の方法

細胞分化—心筋細胞への分化指向性の異なる P19CL6 細胞サブラインは、 α -MHC プロモーターによって発現が制御される EGFP を細胞にトランスフェクトし、その安定発現株のクローニングにより樹立した。マウス EC 細胞の心筋細胞への分化は、1%DMSO により誘導した。マウス ES 細胞 (R1 細胞) の心筋細胞への分化は、分化培地を用いて低吸着丸底プレートで胚葉体を形成させることにより行った。

ジーンチップ解析および生物統計解析—未分化のマウス EC 細胞株 (P19 細胞、P19CL6 細胞および P19CL6 細胞サブライン 4 株) の RNA 抽出の後、網羅的な遺伝子発現解析のためジーンチップ (MOE430A および MOE430B) を用いてマイクロアレイ解析を行った。

マウス EC 細胞株 (P19 細胞、P19CL6 細胞および P19CL6 細胞サブライン 4 株) の心筋分化後に RNA 抽出し、定量 RT-PCR にて心筋特異的マーカー遺伝子の発現量を測定した。主成分分析は、数値の標準化の後に行った。心筋分化の評価は、①心筋特異的マーカー遺伝子発現量の第一主成分得点、②自律拍動を始めた時間、③単位面積当たりの自律拍動を示す小結節数、で行った。ジーンチップデータを用いたスピアマン順位相関係数分析により、発現量が①~③と有意な相関がある 24 遺伝子を CMR (cardiomyogenesis-related candidate) 遺伝子とした (図 1)。

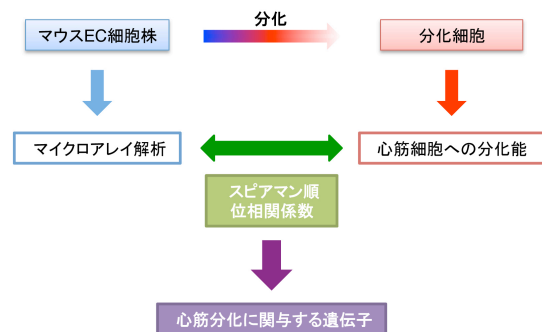


図 1 心筋細胞分化に関与する遺伝子の探索

siRNA トランスフェクション—マウス EC 細胞は 100 nM siRNA を Lipofectamine 2000 を用いて、マウス ES 細胞は 50 nM siRNA を Lipofectamine RNAiMAX を用いてトランスフェクションを行った。

4. 研究成果

同定された24のCMR遺伝子を標的とするsiRNAを、マウスEC細胞とマウスES細胞にトランスフェクトし、mRNA発現量が有意に減少した遺伝子に関して解析を行った。マウスEC細胞はDMSOにより心筋分化を誘導し、分化後14日に単位面積当たりの自律拍動を示す小結節数と心筋特異的のマーカージン遺伝子(α-MHC、β-MHC、MLC2aおよびMLC2v)のmRNA発現量を測定した。またマウスES細胞は胚葉体形成を開始してから8日目に心筋特異的のマーカージン遺伝子のmRNA発現量を測定した(表1)。ノックダウンによりEC細胞とES細胞に共通して心筋分化の抑制または促進が見られた遺伝子として、AW551984、2810405K02Rik(prostamide/prostaglandin F synthase)、Cd302が同定された。

Gene	EC cells					ES cells			
	拍動小結節数	αMHC	βMHC	MLC2a	MLC2v	αMHC	βMHC	MLC2a	MLC2v
Prdm5	↓	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
AW551984	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
D430028G1Rik	↓	↓	NS	NS	↓	NS	NS	NS	NS
5330410G16Rik	↓	↓	NS	↓	↓	NS	NS	NS	NS
Tmem98	↓	↓	NS	NS	↓	NS	NS	NS	NS
Ctsc	↓	NS	NS	NS	↓	NS	NS	NS	NS
F2r	↑	NS	NS	NS	↑	NS	↑	↑	NS
Sema3e	NS	NS	NS	↓	NS	↓	↓	↓	NS
Maged2	↓	NS	NS	NS	↓	NS	↑	↑	↑
2810405K02Rik	↓	↓	NS	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Cd302	↑	↑	NS	NS	↑	↑	↑	↑	NS
Fzd1	↓	↓	↓	↓	↓	NS	NS	NS	NS
Adarb1	NS	NS	NS	NS	NS	↓	↓	↓	↓
Gpaa1	NS	NS	NS	NS	NS	↓	↓	↓	↓
Chst2	↑	NS	↑	↑	↑	NS	NS	NS	NS
9830115L13Rik	↑	NS	↑	NS	NS	NS	NS	NS	NS
9630055N22Rik	↓	↓	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Gstz1	NS	NS	NS	↓	NS	↓	NS	↓	NS
1110021L09Rik	↑	NS	NS	NS	NS	NS	↑	↑	NS
Hnrrpa1	↑	↑	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↓
Adm	↓	NS	NS	NS	NS	NS	↑	↑	NS

表1 EC細胞およびES細胞におけるCMR遺伝子ノックダウンの心筋分化に及ぼす影響(mRNA発現量と第一主成分得点のスパイマン順位相関係数分析におけるp値が低い順に遺伝子は並べてある)

CMR遺伝子のうちAW551984のノックダウンによりEC細胞とES細胞の心筋分化は最も強く制御を受けたため、AW551984の解析を最初に試みた。マウスES細胞(R1細胞)を胚葉体形成によって分化させると、分化開始後8日目に拍動を示す胚葉体が観察され、その後拍動する胚葉体の割合は上昇する。AW551984のmRNA発現量は、拍動開始に先駆け分化開始後5日目に上昇し始め、11日目には40倍に上昇した。また胚葉体の拍動率はAW551984のノックダウンにより有意に抑制された(図2)。

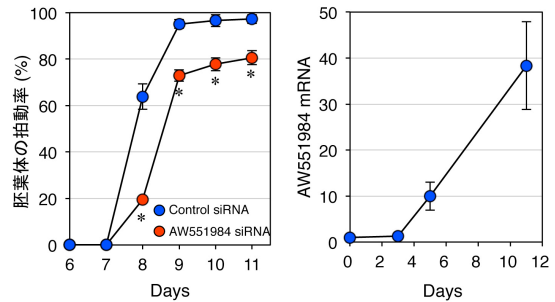


図2 ES細胞の分化における胚葉体の拍動率およびAW551984 mRNA量の経時的変化

AW551984のノックダウンは、多能性マーカーであるNanogおよびOct3/4、中胚葉マーカーであるT/brachyury、心筋前駆細胞マーカーのMesp1の発現に影響しなかったことから、AW551984は心筋前駆細胞から心筋細胞への分化に影響を及ぼしている可能性が考えられた。初期の心筋転写因子であるGata4、Mef2C、Nkx2.5およびTbx5の発現におけるAW551984のノックダウンの影響を検討した。AW551984をノックダウンした分化細胞において、Gata4、Mef2CおよびTbx5の発現量には変化が見られなかったが、Nkx2.5の発現量が有意に減少していた(図3)。これらの結果から、AW551984はNkx2.5の発現量を調節して、心筋分化を制御することが示唆された。

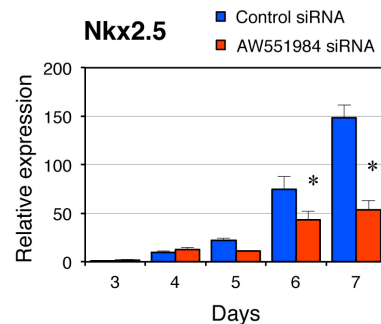


図3 ES細胞の分化におけるNkx2.5 mRNA量の経時的変化

Wnt/β-cateninシグナルは多能性幹細胞から心筋細胞への分化の制御に重要な役割を果たしており、その制御には二相性がある。すなわちWnt/β-cateninシグナルは心筋前駆細胞までの分化には促進的に、心筋前駆細胞からの分化には抑制的に働くことが報告されている。胚葉体を分化開始後2-5日の間、Wnt3aで細胞を刺激すると、AW551984とNkx2.5の発現は有意に上昇した。一方でWnt/β-cateninシグナルを阻害するDkk1で細胞を処理すると、AW551984とNkx2.5の発現は共に有意に阻害された(図4)。これらの結果より、AW551984とNkx2.5の発現はWnt/β-cateninシグナルによって調節されていることが示された。

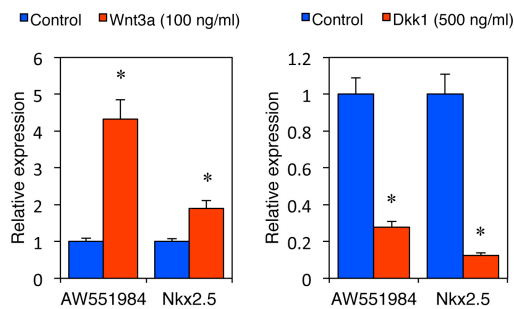


図 4 Wnt/ β -catenin シグナルの AW551984 と Nkx2.5 mRNA 発現量への影響

本研究において、新規の心筋分化制御因子である AW551984 は、Wnt/ β -catenin シグナルによる Nkx2.5 発現を調節することにより、心筋分化を制御することが示唆された。AW551984 以外の心筋分化を制御する機能を有する因子として、prostamide/prostaglandin F synthase と Cd302 も、本研究で同定することに成功した。脂質代謝酵素である prostamide/prostaglandin F synthase の多能性幹細胞における心筋分化制御メカニズムについても今後明らかにしたいと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Kuroda T, Yasuda S, Sato Y. Tumorigenicity studies for human pluripotent stem cell-derived products. *Biol. Pharm. Bull.* 2013;36(2):189-92.
2. 安田智 再生医療における細胞・組織加工製品の品質・安全性の評価 *PHARMSTAGE* 2012;12(7):1-2.
3. Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Hirata N, Kanda Y, Suzuki K, Takahashi M, Nishikawa S, Kawamata S, Sato Y. Highly sensitive in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human iPS cells. *PLoS One.* 2012;7(5):e37342. doi: 10.1371/journal.pone.0037342.
4. Yasuda S, Hasegawa T, Hosono T, Satoh M, Watanabe K, Ono K, Shimizu S, Hayakawa T, Yamaguchi T, Suzuki K, Sato Y. AW551984: a novel regulator of cardiomyogenesis in pluripotent embryonic cells. *Biochem. J.* 2011;437 (2):345-355.

[学会発表] (計 6 件)

1. 草川森士、町田一彦、安田智、黒田拓也、澤田留美、伊藤守、堤秀樹、川真田真、

佐藤陽治 細胞・組織加工製品の製造工程管理法としてのNOGマウス造腫瘍性試験系のバリデーション 第12回日本再生医療学会総会、横浜 (2013年3月)

2. 佐藤光利、中島みどり、倉持智美、安田智、佐藤陽治 ヒト脂肪由来間葉系幹細胞における虚血応答性制御因子の特性解析 第86回日本薬理学会年会、福岡 (2013年3月)
3. 草川森士、船田正彦、安田智、黒田拓也、山内淳司、佐藤陽治 レポーター蛋白を利用した多能性幹細胞の神経分化の評価 第35回日本神経科学大会、名古屋 (2012年9月)
4. Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Suzuki K, Kawamata S, Sato Y. Validation of in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human induced pluripotent stem cells. International Society for Stem Cell Research 10 th Annual Meeting, Yokohama (2012年6月)
5. 黒田拓也、安田智、草川森士、鈴木和博、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残存する未分化細胞のin vitro 高感度検出法の開発と評価 第11回日本再生医療学会総会、横浜 (2012年6月)
6. Yasuda S, Hasegawa T, Hosono T, Satoh M, Yamaguchi T, Suzuki K, Sato Y. Identification of genes that regulate cardiomyogenesis in mouse pluripotent embryonic cells. International Society for Stem Cell Research 9 th Annual Meeting, Toronto, Canada (2011年6月)

[図書] (計 2 件)

1. 安田智、佐藤陽治 安全性評価の総論、造腫瘍性試験の現状と展望「幹細胞医療の実用化技術と産業展望」pp247-255 (2013)、シーエムシー出版
2. 安田智、佐藤陽治 再生医療に対する規制・制度等について：欧米の動向「幹細胞技術の標準化－再生医療への期待」pp206-214 (2012)、日本規格協会

[その他]

ホームページ等

<http://www.nihs.go.jp/cgtp/cgtp/sec2/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・遺伝子細胞医
薬部・室長

研究者番号：20381262