

Fig.19 移植チューブ内のゲルに蛍光染色したHUVECを浮遊させ培養2週間後の光顕写真

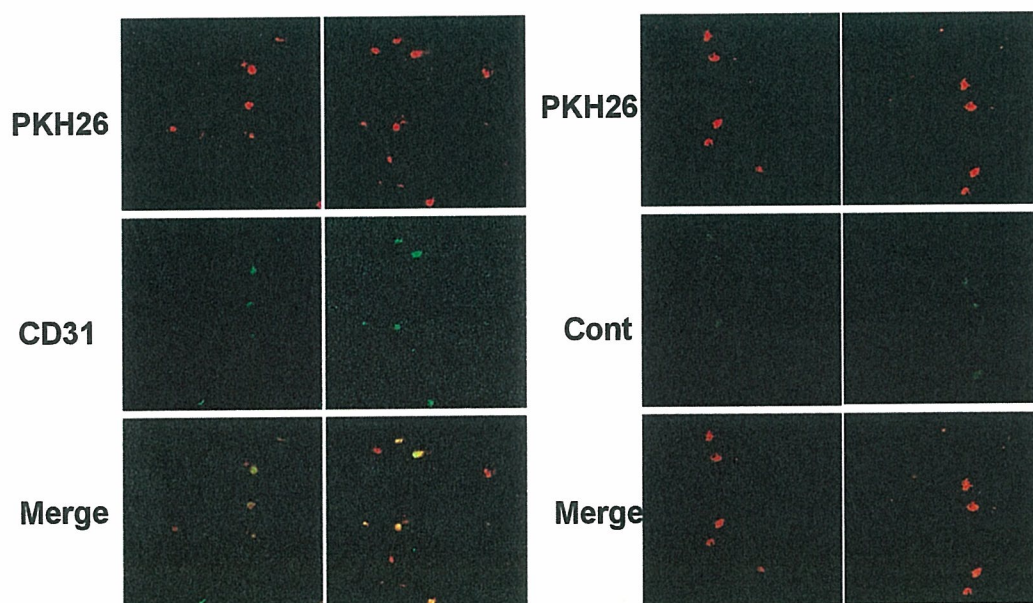


Fig.20 チューブ内の蛍光染色したHUVECの抗CD31抗体-FITCを用いた免疫染色

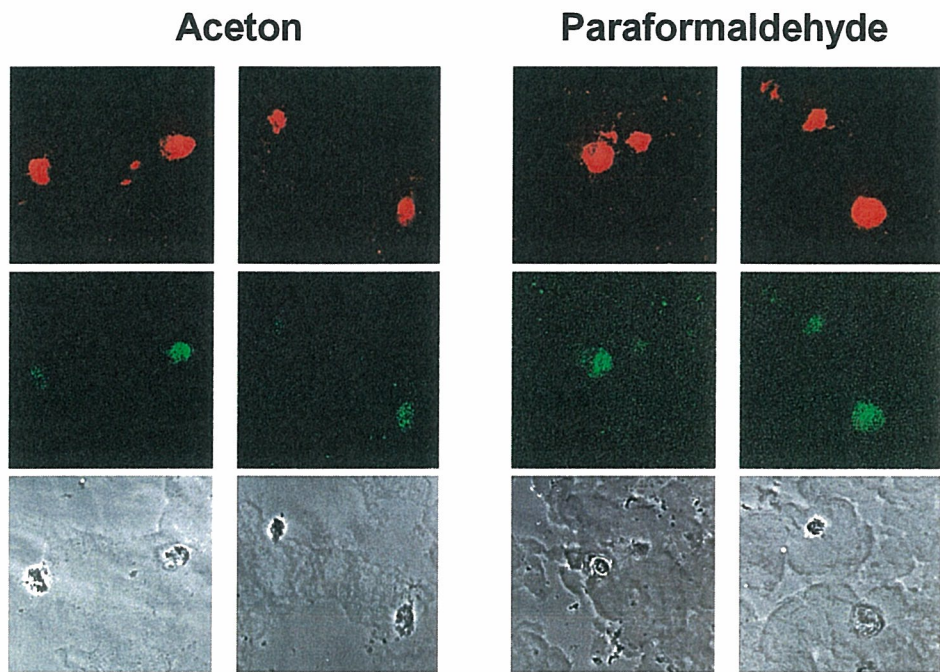


Fig.21 チューブ内のHUVECのアセトン固定とホルマリン固定の比較

厚生労働科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)
分担研究報告書

細胞特性解析技術の開発に関する研究

分担研究者 佐藤 陽治 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部・第2室・室長

細胞治療薬の品質と、それに基づく再生医療の有効性と安全性を確保するために、未分化細胞の分化能評価手法の確立は重要である。本研究では細胞治療薬への未分化細胞の適用の一環として、未分化細胞中に存在し、かつ特定の細胞種への分化に寄与する遺伝子の同定法の開発を、心筋細胞分化を例にして行った。マウス胚性癌細胞株である P19 細胞由来の数種の細胞株を用い、同一条件下で分化誘導した各細胞株の心筋細胞分化能の比較を行った。同時に、分化誘導前の遺伝子発現プロファイルを得て、分化誘導前の発現量と心筋細胞分化能が相関する遺伝子に着目し、未分化細胞中に発現する心筋細胞への分化に寄与する因子を探索した。その結果、分化誘導前の発現量と心筋細胞分化能との有意な相関性を示す 24 個の遺伝子 Cardiomyogenesis Predictor Candidate (CMP)が見出された。さらに、RNAi を用いて各 CMP 遺伝子の発現を阻害し、これらの遺伝子の心筋細胞分化への関与を評価した。その結果、CMP1、CMP2、CMP3、CMP4、CMP5、CMP6、CMP8、CMP9、CMP10、CMP13、CMP18、CMP20、CMP24 は、その発現が阻害されることにより心筋細胞分化が抑制され、逆に、CMP7、CMP12、CMP16、CMP17、CMP21、CMP23 は、その発現が阻害されることにより、心筋細胞分化が促進されることが明らかとなった。本研究により、未分化段階を含む分化過程において、細胞における複数の特定遺伝子の発現量が、細胞の心筋分化活性と相関性を示す知見を得た。また、CMP 遺伝子の中には、未分化細胞の心筋細胞への分化において重要な生理的役割を果たしているものが存在することが示唆された。未分化細胞におけるこれらの遺伝子あるいはその遺伝子産物をマーカーとすることにより、細胞の心筋分化活性の検出が可能になると考えられた。

研究協力者

長谷川哲也	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部
細野哲司	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部
佐藤光利	東邦大学薬学部

A. 研究目的

疾患や事故により損なわれた細胞の機能を回復させるための方法として、臓器移植技術や人工臓器の技術が進んでいる。しかし、臓器移植には臓器提供者の不足、脳死判定の難しさ、拒絶反応、医療費などの多くの問題があり、また人工臓器も十分に機能を果たすものの開発が遅れているた

め、誰もが容易に享受できる医療とはなっていない。近年のバイオテクノロジーをはじめとした科学技術の進歩により、ヒトまたは動物の細胞や組織を培養・加工した後に損傷部位に移植することで本来の機能を回復させる、いわゆる再生医療が誕生してきた。幹細胞技術の進歩により、いかなる組織の細胞にも幹細胞を分化誘導できる可能性が示され、また自己の細胞を用いれば移植による拒絶反応も回避することが出来、致死性疾患や不可逆的組織損傷の治療への応用に大きな期待が寄せられている。細胞移植治療としては、培養皮膚の移植による熱傷などの治療、培養羊膜および培養角膜の移植による眼疾患治療、閉塞性動脈硬化症および心筋梗塞病巣に対する幹細胞移植

による血管再生、非荷重部軟骨細胞および間葉系幹細胞による関節軟骨欠損部の治療など、著明な臨床的有効性がすでに報告されている例も数多く存在する。しかしながら、積極的に細胞移植治療の様々な方法が開発されつつある一方、医薬品としての細胞治療薬の品質および安全性の確保を行うための評価技術に関して、必ずしも十分な検討が行われているとは言えない。細胞を生体外で培養・加工するために混入の可能性がある感染性物質や汚染物質の排除はもとより、細胞の安定性や腫瘍原性の問題、免疫原性、細胞の純度・同一性の評価方法など、検討すべき課題は多い。また、幹細胞技術は進歩したものの、幹細胞から目的細胞までの分化機構が分子レベルで完全に解明されていない。そのため、医薬品としての細胞が治療に用いられた場合に生体内で予期せぬ、かつ生体に悪影響を及ぼす挙動を示す副作用の可能性、あるいは生着せず効果が認められない可能性がある。こうした可能性を予測および制御する方法を開発するにも科学的な根拠が不可欠である。

本研究では細胞・組織利用医薬品に用いられる細胞の品質や安全性を確保するため、細胞の特性を迅速かつ高精度に評価する方法の開発を行う。具体的には、分化に至るために重要な役割を果たすマーカー遺伝子やタンパク質、目的の方向に分化する細胞を識別する指標となるマーカー遺伝子およびタンパク質を探索する。標的細胞の特性を代表するマーカー遺伝子群およびマーカータンパク質群を同定し、複数のマーカー群の発現解析により構築される細胞特性の評価システムの妥当性および応用可能性を検討する。特に本研究では未分化細胞からの心筋細胞分化系を細胞特性解析システム構築のモデルケースとした。

近年、心筋細胞に分化可能な未分化細胞が成体心臓内に存在することが明らかとなったにもかかわらず、障害を受けた心筋はほとんど再生する能力がない。そのため、心筋梗塞・心筋炎による壊死やアポトーシスにより細胞数が減少した結

果生じる心不全は、残存する心筋細胞に過度の負荷がかかり障害が進展する進行性で生命予後の極めて悪い病態である。

レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系を代表とする神経内分泌因子の異常と交感神経系の過緊張を伴った全身疾患と考えられている心不全は、その病態に基づきアンジオテンシン変換酵素阻害薬やアンジオテンシンII受容体拮抗薬、 β アドレナリン受容体遮断薬、アルドステロン拮抗薬などの利尿薬の併用による薬物療法が治療の標準となっている。これらの内科的治療を最大限に行っているにも関わらず、安静時に著名な症状があるほど心不全が重症化した場合には、機械的補助循環（補助人工心臓）、心臓移植等が考慮される。しかし、体外設置型の補助人工心臓は退院自宅復帰が難しいため患者のQOLが損なわれる。また、2004年に保険適応となった体内埋め込み型補助人工心臓においても、体格が小さいため適応とならない症例がわが国では多いなどの問題がある。さらに、心不全の根治的な治療法である心臓移植も、深刻なドナー不足や移植後の拒絶、長期にわたる免疫抑制の使用とそれに伴う感染症・悪性腫瘍の発症など、解決困難な多くの問題を残している。

これに対し、未分化細胞を心筋細胞に分化誘導し、これを移植治療の材料として使う再生医療の研究が新たな展開をもたらそうとしている。しかし、この治療法には大きな期待が寄せられているものの、近年の臨床研究により、十分量の心筋細胞が得られないことや適した表現型が得られないことによる有害事象発症の危険性などの問題が明らかとなった。こうした問題を解決する方法の一つとして、未分化細胞の分化傾向予測法の確立が挙げられる。すなわち、心筋細胞移植治療の安全性向上のためには未分化細胞の心筋細胞への分化のしやすさ、すなわち「心筋細胞分化活性」を適切に予測することが重要と考えられる。そこで、筆者らは、未分化細胞中に存在し、かつ心筋細胞への分化に寄与する遺伝子の同定を試みた。

心筋細胞分化研究において、有力なツールとして期待されている細胞株の一つに、マウス胚性癌細胞(EC細胞)由来のP19細胞がある。この細胞は多分化能を有しており、胚性幹細胞(ES細胞)のようなフィーダー細胞との共培養の必要がなく、胚様体の形成後、接着培養条件下でジメチルスルフォキシド(DMSO)処理することのみにより簡便に心筋細胞に分化させることができる。P19細胞のサブラインであるCL6細胞もP19と同様に多分化能を有しているが、P19細胞とは異なり、心筋細胞への分化誘導の際に胚様体を形成させる必要がなく、接着培養条件下でDMSO処理することのみで、より簡便に心筋へと分化させることができる。また、CL6細胞はP19細胞と比較してより効率的に心筋細胞へと分化することも明らかにされている。さらに、筆者らの予備的な検討において、心筋 α ミオシン重鎖(α MHC)プロモーターによりgreen fluorescent protein(GFP)が発現するように設計されたCL6細胞サブライン間でも、心筋細胞になりやすい株となりにくい株とで分化効率の大きな違いが認められた。

筆者らはこの分化効率の差を基に、P19細胞とCL6細胞およびCL6細胞由来の数種の細胞株を用い、同一条件下で分化誘導した後の各細胞株の心筋細胞分化能を比較すると同時に、分化誘導前の遺伝子発現プロファイルを得て、分化誘導前の発現量と心筋細胞への分化能との間に相関関係が得られるような遺伝子をスクリーニングすれば、未分化細胞中に発現する心筋細胞への分化に寄与する因子を検出することが可能であると考えた。

そこで、これらの細胞の心筋への分化能を比較するために、心筋細胞に分化誘導した後、定量リアルタイムRT-PCRで分化誘導後の心筋細胞特異的なマーカー遺伝子の発現を測定した。さらに、これらの細胞の分化誘導前の遺伝子発現プロファイルを得るために、マイクロアレイ解析を行った。そして、これらを統計学的に解析し、分化

誘導前における発現が心筋への分化能と関連する遺伝子を探した。さらに、RNAiを用いて、これらの遺伝子の機能を阻害することにより、各遺伝子の心筋細胞分化との因果関係を評価した。

B. 実験材料と方法

B-1 使用細胞

マウス由来の胚性癌細胞P19細胞はAmerican Type Culture Collection(ATCC)より、P19細胞由来の細胞株であるCL6細胞はRIKEN Cell Bankより入手した。

さらに、このCL6細胞由来の細胞株であるCL6G26、CL6G36、CL6G45、CL6G52は、筆者らによってFig.1のようにして作製された。すなわち、マウス α ミオシン重鎖(α MHC)プロモーターおよびヒト成長ホルモンポリアデニレーションシグナルを組み込んだpBluescript SK(+)
ベクターはJeffery Robbins博士(Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, U.S.A)から供与を受けた。 α MHCプロモーター配列の下流かつヒト成長ホルモンのポリアデニレーションシグナルの上流にあるSal IサイトとHind IIIサイトの間にpEGFPベクター(Clontech)由来のgreen fluorescent protein(GFP)コード配列を導入したベクターを定法により作製した。このベクター21.6 μ gとNeomycin耐性遺伝子をもつベクターであるpcDNA3.1(+)
2.4 μ gを血清および抗生物質を含まないMinimum Essential Medium Eagle Alpha Modification(α MEM, Sigma)1.5mlに穏やかに希釈した。一方、Lipofectamine2000(Invitrogen)60 μ lを血清および抗生物質を含まない α MEM1.5mlに穏やかに希釈した。Lipofectamine2000の希釈液を5分間室温で放置した後、DNAベクターの希釈液と穏やかに混和し、20分間室温で放置することによりDNAとLipofectamine2000との複合体を形成させた。次段落で詳説する基本培地10mlを用いてCL6細胞を直径100mmのディッシュ上で40~50%の

コンフルエンスとなるように培養し、これに DNA と Lipofectamine2000 との複合体希釈液 (計 3ml) を添加することにより DNA をトランスフェクションした。トランスフェクション後 2 日経過した時点より Geneticine (G418, Sigma) (濃度 1mg/ml) 存在下で培養し、単一コロニーを単離することにより、Neomycin 耐性遺伝子を含む CL6 細胞サブラインをクローニングした。分化誘導後の GFP の発現を ARVO sx MULTILABEL COUNTER を用いて GFP の蛍光を測定することにより評価したところ、本研究で用いた CL6 のサブラインのうち、心筋細胞分化誘導後に GFP の発現が認められたのは CL6G52 のみであった。

B-2 細胞の培養法および分化誘導法

未分化な状態での細胞の培養には基本培地を用い、直径 100 mm の細胞培養ディッシュ (Falcon または Corning) 上、5%CO₂ 存在下 37°C で、コンフルエントにならないように注意しながら行った。基本培地の組成は、 α MEM に非働化したウシ胎仔血清 (FCS, Lot No. 29080306, Cell Culture Technologies) を 10%、L-glutamine (Sigma) を 2mM、Penicillin-Streptomycin (Gibco) を 100unit/ml の濃度になるようにそれぞれ添加したものである。

心筋細胞への分化誘導は、ディッシュ面積に対して 50~70%程度まで増殖させた未分化な細胞を用いて行った。まず、基本培地を除去し、Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS, Sigma) 5ml で 2 回洗浄した。次に、trypsin-EDTA (Gibco) 1ml で細胞全体を軽く濡らして、直ちに除去、5%CO₂ 存在下 37°C で 3 分間、その後、室温で 5 分弱インキュベートし、分化培地 5ml に懸濁した。この細胞懸濁液を細胞培養容器に分注した後、5%CO₂ 存在下 37°C で培養し、これを用いて各実験を行った。分化培地は基本培地に dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma) を 1% の濃度になるように添加したものである。

B-3 培養細胞からの total RNA の抽出

培養細胞からの total RNA の抽出は、SV Total RNA Isolation System (Promega)、RNesay Midi (QIAGEN)、RNesay Mini (QIAGEN)、BioRobot M48 Workstation (QIAGEN) のいずれかを用い、各社のマニュアルに従って行った。RNA サンプルの濃度は 260nm の吸光度を測定することで評価し、260nm の吸光度と 280nm の吸光度の比を指標に純度を確認した。

抽出したサンプルは -80°C で冷凍保存した。

B-4 心筋組織からの total RNA の抽出

心筋組織からの total RNA の抽出は以下のように行った。まず、9 週齢の雄の C3H/He マウス 4 匹より心室筋を取り出し 1ml Sepazol (Nacalai Tesque) / Heart を加えて Polytron ホモジナイザーを用いてホモジナイズし (氷冷下、最高速度で 10 秒回転×3 回)、4 匹分を合わせてから 1ml ずつ分注した。次に、クロロホルム 200 μ l / tube を添加し、緩く攪拌した後、室温で 2~3 分放置し、12,000×g、4°C で 15 分間遠心分離した。上層 500 μ l / tube を 500 μ l / tube のイソプロパノールと混ぜて攪拌し、室温で 10 分以上放置し、12,000×g、4°C で 10 分間遠心分離した。上清を除去し、沈殿に 75%エタノールを 500 μ l / tube 加えて攪拌し、7,500×g、4°C で 5 分遠心分離した後、沈殿を風乾 (5 分未満) した。続いて沈殿を D Nase I (H₂O+10×buffer + DNase I [Promega]) 溶液 30 μ l / tube で溶解させ、37°C で 30 分インキュベーションした。この後、フェノール / クロロホルム / イソアミルアルコール混合液 (Gibco) を 30 μ l / tube 添加し、緩く攪拌した後、室温で 2~3 分放置し、12,000×g、4°C で 15 分遠心分離した。上層 27 μ l / tube をイソプロパノール 27 μ l / tube と混ぜて攪拌した後、室温で 10 分以上放置し、12,000×g、4°C で 10 分遠心分離した。沈殿に 75%エタノールを 54 μ l / tube 加えて攪拌し、7,500×g、4°C で 5 分遠心分離し、沈殿を風乾した後に、40U / μ l RNase

Inhibitor 入り H₂O (30 μ l/tube) で沈殿を溶解した。濃度が均一になるように 4 本を混ぜて、10 μ l ずつ分注、これらの吸光度 (260nm) を測定することで濃度を測定した。抽出したサンプルは -80°C で冷凍保存した。

B-5 分化誘導後の心筋細胞特異的マーカー遺伝子発現の測定

P19 細胞、CL6 細胞、および CL6 細胞サブラインの CL6G26、CL6G36、CL6G45、CL6G52 の 6 種類の細胞を分化誘導処理し、6 穴細胞培養用マルチウェルプレート (Falcon) に各細胞株 6 枚ずつ 1×10^5 cells/well の密度で蒔いた。これを、5%CO₂ 存在下、37°C で 20 日間培養し、培地は 2 日毎に交換した。分化誘導後、8 日目、12 日目、16 日目、20 日目に SV Total RNA Isolation System (Promega) を用いて、total RNA を抽出した。

測定した心筋細胞特異的マーカー遺伝子は、Nkx 2.5、GATA4、MEF2C、 α MHC、 β MHC、MLC2a、MLC2v の 7 種類。これらに加え、各遺伝子の発現量を補正するために、内部標準として 18S rRNA の発現量を測定した。

精製した各細胞の total RNA は、測定するマーカーごとに検量線が成り立つ範囲に入るような濃度で希釈した。また、検量線用サンプルとして、B-4 で精製したマウス心筋由来の total RNA を用いた。

遺伝子発現の定量のために、TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents (Applied Biosystems) および ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いて RT-PCR を行い、PCR の時間経過をリアルタイムで取得した。

3~15 サイクルの間に検出されたシグナルからベースラインを設定し、これをもとに増幅が指数関数的に起こる領域でシグナルの閾値を設定した。シグナルの閾値に到達するサイクル数 (Threshold Cycle: Ct 値) を縦軸に、初期の RNA

量の対数を横軸にプロットし、検量線を作成した。目的の遺伝子のサンプルについても、Ct 値を求めることにより検量線からサンプル中の目的の RNA 量を算出した。心筋細胞特異的マーカー遺伝子の RNA 発現量はサンプルの平均値と標準偏差により標準化した後、統計ソフトウェア SYSTAT (SYSTAT Software) により主成分分析し、心筋細胞分化の指標となる主成分を得た。

なお、ここで用いたプライマーおよびプローブの配列は Table 1 に示す通りである。

B-6 分化誘導前における各細胞株の遺伝子プロフィールの取得

P19 細胞、CL6 細胞、および Neomycin 耐性遺伝子を含む CL6 細胞サブラインの CL6G26、CL6G36、CL6G45、CL6G52 の 6 種類を分化誘導処理せず、6 穴細胞培養用マルチウェルプレート (Falcon) に 8 枚ずつ 1×10^5 cells/well の密度になるように蒔いた。これを 5%CO₂ 存在下 37°C で培養し、コンフルエントになる前に RNeasy Midi (QIAGEN) で細胞を回収し、その細胞の 6 ウェル分を 1 つにまとめた後、RNA を抽出した。

これを RNeasy Mini (QIAGEN) で 2 回精製した後、260nm の吸光度を測定することで濃度を測定し、260nm/280nm の比から純度を確認した。GeneChip (Affymetrix) により遺伝子発現を網羅的に解析するために、まず各細胞株について濃度が高く、かつ純度の高いサンプル 5 個ずつを選択した。Affymetrix 社のマニュアルに従い、各 RNA サンプルから cDNA を合成し、次いで cDNA をもとにしてビオチン化 cRNA 断片を合成した。GeneChip Hybridization Oven を用いてビオチン化 cRNA 断片を GeneChip にハイブリダイズさせ、次いでハイブリダイズした cRNA を GeneChip Fluidics Station を用いてストレプトアビジン-フィコエリスリンで染色することにより可視化し、GeneChip Scanner 3000 で走査した。得られた蛍光データは GCOS ソフトウェア (Affymetrix) で解析した。GeneChip は

MOE430A (Probe Set 数 22,626) と MOE430B (Probe Set 数 22,511) を用いた。検出された遺伝子からシグナルの高い方から 2%および低い方から 2%を除いた時の、残りの Probe Set の平均値が 500 になるようにスケーリングした。これに次に示すようなフィルターをかけて、各細胞株の心筋細胞分化能と相関のある遺伝子を検出した。ここで検出された遺伝子を、Cardiomyogenesis Predictor Candidate (CMP)と名づけた。

フィルター①：GCOS で解析された各 Probe Set のシグナルは Absolute Analysis (発現の有無を判定する解析) の結果「発現があるもの:P (Present)」、「発現があるかわからないもの:M (Marginal)」あるいは「発現がないもの:A (Absent)」として判定がなされる。細胞株各群の 5 例の半数以上 (つまり 3 例以上) で P と判定された Probe Set については、当該細胞株においてその Probe Set がコードする遺伝子が発現していると判断した。逆に各群の 5 例のうち P 判定されたものが 2 例以下の場合には当該細胞株においてその Probe Set をコードする遺伝子の発現はないと判断した。

細胞株のうち少なくとも 1 株以上において発現が見られる Probe Set は次のフィルターをかけ、全ての細胞株で発現が見られない Probe Set は棄却した。

フィルター②：一元配置分散分析 (One-Way ANOVA) で細胞株間の遺伝子発現の平均値の比較を行い、有意水準 5% の条件で帰無仮説が棄却できたもの、すなわち 6 細胞株の中で発現が飛びぬけて多いもしくは少ないものが少なくとも 1 つは存在する結果が出た Probe Set は次のフィルターをかけ、いずれの細胞株間でも有意差が認められなかった Probe Set は棄却した。

フィルター③：細胞株間の遺伝子発現の差の平均値が 50% 以上のあるもの、すなわち 6 細胞株の最低の平均値と最高の平均値の差が 2.5 倍以上あ

る Probe Set は次のフィルターをかけ、差が 2.5 より小さいものは棄却した。

フィルター④：GeneChip で得られた各 Probe Set の発現シグナルと自律拍動する小結節出現までの日数、自律拍動する小結節数、定量性リアルタイム RT-PCR によって得られた分化後の心筋遺伝子発現データの第 1 主成分もしくは第 2 主成分との間でスピアマンの順位相関係数を算出、有意水準 5% の条件で有意性を検討し、有意な相関がある Probe Set を抽出した。スピアマンの順位相関係数および有意確率 (P 値) の算出は Glantz, S.A による著書 (Primer of Biostatistics [Fifth Edition], McGraw-Hill, 2002, pp.273-277) および群馬大学社会情報学部・青木繁伸「統計学自習ノート」の「スピアマンの順位相関係数」の項 <http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/lecture/Soukan/spearman.html> に基づき、マイクロソフトエクセルを用いて行った。

B-7 RNAi による CMP 遺伝子の機能阻害

Neomycin 耐性遺伝子を含む CL6 細胞サブラインのうち、最も効率よく心筋細胞に分化する株である CL6G52 を分化誘導処理せず、24 穴細胞培養用マルチウェルプレート (Falcon) に 1×10^4 cells / well となるように蒔いた。これを 37°C、5%CO₂ で一晩培養後、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて各 CMP 遺伝子特異的な Stealth RNAi (Invitrogen) (CMP11 については QIAGEN 社製 siRNA) を導入し、B-6 項において心筋細胞分化能と相関の得られた遺伝子をノックダウンした。

まず、各細胞を抗生物質不含の基本培地 500 μ l で 2 回洗浄し、各ウェルに同培地 400 μ l を加えた。次に、1 ウェル当たりの siRNA が 40 pmol となるように、蛍光オリゴとして BLOCK-iT (Invitrogen) (最終濃度 10 pmol/well) を含む、OPTI-MEM I Reduced Serum Medium (Gibco) で希釈した。また、ネガティブコントロールとし

て、Stealth RNAi Negative Control Duplexes (Invitrogen) を同様に希釈した。その後、Lipofectamine 2000 を $1.5 \mu\text{l}$ /well となるように、OPTI-MEM I Reduced Serum Medium で希釈し、室温で 5 分インキュベートした。このようにして希釈した siRNA 溶液またはネガティブコントロール溶液 $50 \mu\text{l}$ と Lipofectamine 2000 溶液 $50 \mu\text{l}$ を緩やかに混和し、複合体を形成させるために室温で 20 分間インキュベートした。この複合体を $100 \mu\text{l}$ ずつ各ウェルに加えて緩やかに振盪しながら混ぜ、5%CO₂ 条件下 37°C で 48 時間インキュベートした。

B-8 CMP 遺伝子のノックダウン効率の測定

RNAi を行った各遺伝子が、実際にノックダウンされているかどうかについて、定量性リアルタイム RT-PCR を用いて測定した。

B-7 項に示すように、RNAi を行った後、細胞から RNesay Mini (QIAGEN) または BioRobot M48 Workstation (QIAGEN) を用いて、total RNA を抽出した。これを、検量線が成り立つ範囲に入るように、 $2\text{ng}/\mu\text{l}$ に希釈し、未知サンプルとした。スタンダードサンプルとして、未分化な CL6G52 を直径 100mm の細胞培養ディッシュ (Falcon) でコンフルエントにならないように培養し、これから BioRobot M48 Workstation (QIAGEN) を用いて、total RNA を抽出した。

この RNA サンプルについて TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents (Applied Biosystems) および ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いて B-5 項と同様に RT-PCR を行った。CMP19 については、RNAi 群で遺伝子の検出ができなかったため、予備的な検討において TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents (Applied Biosystems) よりも検出感度が優れていた QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) を用いて再度測定した。得られた結果は、18S rRNA の発現値を用いて補正し、各サン

ブルの補正値をネガティブコントロールの補正値と比較することで、各遺伝子の発現量の変動を解析した。

B-9 CMP 遺伝子の機能阻害後における心筋細胞分化効率の測定

RNAi を用いて機能阻害を行った CL6G52 を用いて、CMP 遺伝子が心筋細胞への分化効率にどのように影響するかを評価するために、自律拍動する小結節数の計測および心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現を測定した。まず、B-7 項に述べたように RNAi を行った後、CL6G52 細胞を分化誘導処理した。これを 5%CO₂ 条件下 37°C で培養し、2 日毎に培地交換および自律拍動する小結節数を計測した。計測された小結節数は、統計ソフトウェア SigmaStat (SYSTAT Software) を用いて、反復測定二元配置分散分析 (Two-Way Repeated Measures ANOVA) で解析した。また、分化誘導後 14 日目に、RNesay Mini (QIAGEN) または BioRobot M48 Workstation (QIAGEN) を用いて、細胞から total RNA を抽出し、心筋細胞特異的マーカー遺伝子である α MHC、 β MHC、MLC2a、MLC2v の発現を定量した。

発現の定量は抽出した total RNA を鋳型として、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム RT-PCR をすることにより行った。

得られた結果は、18S rRNA の発現値を用いて補正し、各サンプルの補正値をネガティブコントロールの補正値と比較することで、各遺伝子の発現量の変動を解析した。

ここで用いた、プライマーおよびプローブの配列については Table 1 を参照。

B-10 倫理面への配慮

動物実験およびヒト由来組織を用いた実験は実施していない。

C. 結果

C-1 P19 系列細胞の心筋細胞分化

P19 系列細胞の心筋細胞分化を観察した結果、分化誘導処理後、約 4 日でコンフルエントとなり、約 10 日で自律拍動する小結節が認められるようになった。この自律拍動する小結節は、時間とともにその数が増え、約 16 日でその数の増加がプラトーになった。CL6G52 は、自律拍動する小結節の出現とともに、GFP の発現が認められた (Fig.2A-C)。小結節の数が、0.016 個/cm² 以上 (6 穴細胞培養用マルチウェルプレート 1 枚につき 1 つ以上)ある時を「少ない」、0.098 個/cm² 以上 (6 穴細胞培養用マルチウェルプレートのウェル 1 つにつき 1 つ以上)ある時を「中程度」、157 個/cm² 以上 (顕微鏡視野(×200)を 1 面につき 1 つ以上)ある時を「多い」と定性的に定義し、それぞれを 1、2、3 とした場合、分化誘導後の自律拍動する小結節数の時間変化は細胞株により異なっていた (Fig.2D)。

C-2 分化誘導後の心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現

各細胞株の心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現量を比較するために、分化誘導した P19 細胞と CL6 細胞、および Neomycin 耐性遺伝子を含む CL6 細胞サブラインの CL6G26、CL6G36、CL6G45、CL6G52 の 6 種類の細胞から total RNA を抽出し、定量性リアルタイム RT-PCR を用いて心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現量を測定した。このことにより、細胞株の違いによって心筋細胞特異的マーカー発現の時間経過や発現量に相違があることが確認された (Fig.3)。

心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現を心筋細胞分化と関連付けて解釈する際、個々の心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現量にどの程度の重み付けをした上で解釈してよいかは明らかではない。そこで、得られた多くのデータをよりわかりやすくするために主成分分析し、これによって産出された主成分から細胞株による分化の違

いについて比較検討した。心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現量を主成分分析したところ、寄与率 63% の第 1 主成分と寄与率 17% を説明する第 2 主成分が算出された (Fig.4)。寄与率と変量プロットを見ると、資料の本質の約 63% を説明する第 1 主成分は全ての変量の係数が正であり、資料の本質の約 17% を説明する第 2 主成分は心筋細胞分化の比較的初期に発現が見られる心筋細胞特異的マーカー遺伝子の係数が負に、比較的後期に見られる心筋細胞特異的マーカー遺伝子の係数が正に出ている (Fig.4 A および B)。個々のサンプルにおける各心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現を統合して主成分得点として表すと細胞株による心筋細胞への分化能の違いがより明確に見られるようになった (Fig.4 C および D)。

C-3 心筋細胞分化能と相関関係の認められた遺伝子の検出

P19 細胞と CL6 細胞、Neomycin 耐性遺伝子を含む CL6 細胞サブラインの CL6G26、CL6G36、CL6G45、CL6G52 の 6 種類について、①分化誘導後の心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現の第 1 主成分の最大値、②第 2 主成分の最大値、③自律拍動する小結節出現までの日数および④出現した自律拍動する小結節の数、の 4 項目について、GeneChip の遺伝子発現シグナルとの間のスピアマンの順位相関とその有意確率を算出し、心筋細胞分化と相関する遺伝子を探索した。

その結果、第 1 主成分、自律拍動する小結節出現までの日数、出現した収縮小結節の数の 3 項目が発現シグナル値と相関するプローブセットが 24 個検出された (Table 2)。これには、第 2 主成分と有意に相関するものも含まれていた。

C-4 CMP 遺伝子発現阻害と心筋細胞分化効率

RNAi を行うことで、各 CMP 遺伝子をノックダウンし、心筋細胞分化効率への影響を検討した。実際に各遺伝子が RNAi によりノックダウンさ

れていることを確認するために、定量性リアルタイム RT-PCR でノックダウン効率を測定した。その結果、ネガティブコントロールと比較して、CMP1 で 45%、CMP2 で 13%、CMP3 で 43%、CMP4 で 45%、CMP5 で 27%、CMP6 で 19%、CMP7 で 30%、CMP8 で 25%、CMP9 で 15%、CMP10 で 12%、CMP11 で 86%、CMP12 で 51%、CMP13 で 51%、CMP14 で 60%、CMP15 で 37%、CMP16 で 53%、CMP17 で 19%、CMP18 で 35%、CMP19 で 28%、CMP20 で 46%、CMP21 で 55%、CMP22 で 86%、CMP23 で 29%、CMP24 で 34% まで発現を抑制することができた。t 検定の結果、11、19、22 を除く 19 個の CMP 遺伝子で有意な発現の抑制が認められた (Fig.5)。

これについて、CMP 遺伝子のノックダウンにより心筋細胞分化にどのような影響が出るかを、自律拍動する小結節数および心筋細胞特異的マーカー遺伝子 4 種類を測定することによって調べた。

まず、自律拍動する小結節数を測定した結果を Fig.6 に示す。Two-Way Repeated Measures ANOVA で検定した結果、CMP1、CMP2、CMP3、CMP4、CMP5、CMP6、CMP9、CMP10、CMP13、CMP18、CMP24 のノックダウンにより、ネガティブコントロールと比較して有意な小結節数の減少が認められた。逆に、CMP7、CMP12、CMP16、CMP17、CMP21、CMP23 では有意な増加が認められた。また、CMP8、CMP14、CMP15、CMP20 では有意な変化が認められなかった。

次に、分化誘導後 14 日目における、心筋細胞特異的マーカー遺伝子を測定した結果を Fig.7-10 に示す。t 検定の結果、 α MHC では、CMP2、CMP3、CMP4、CMP5、CMP10、CMP13、CMP18 で有意な減少が、CMP12、CMP23 で有意な増加が認められた。 β MHC では、CMP2、CMP13 で有意な減少が、CMP16、CMP17、CMP23 で有意な増加が認められた。MLC2a では、CMP2、CMP4、CMP8、CMP10、CMP20、CMP23 で有意な減少が、CMP16 で有意な増加が認められた。

MLC2v では、CMP2、CMP3、CMP4、CMP5、CMP6、CMP10、CMP13 で有意な減少が、CMP7、CMP12、CMP16、CMP23 で有意な増加が認められた。

これらをまとめたものを、Table 3 に示す。

D. 考察

D-1 心筋細胞分化能と相関する遺伝子

P19 細胞と CL6 細胞、および Neomycin 耐性遺伝子を含む CL6 細胞サブラインの CL6G26、CL6G36、CL6G45、CL6G52 の 6 種類の細胞の心筋細胞分化能を検討するために、定量性リアルタイム RT-PCR を用いて心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現量を測定した。ここで測定したマーカーは心筋線維遺伝子としてミオシン軽鎖 2a (MLC2a)、ミオシン軽鎖 2v (MLC2v)、 α ミオシン重鎖 (α MHC)、 β ミオシン重鎖 (β MHC) の 4 種、心筋細胞分化関連転写因子として Nkx2.5、GATA4、MEF2C の 3 種である。しかし、これら 7 種のマーカーから得られたデータをそのまま用いて分析するには資料の数が多く複雑すぎる上、個々のマーカー遺伝子の発現にどの程度の重み付けをした上で解釈してよいかは明らかではない。そこで、これらのデータから本質的な情報を引き出すためにこれらを主成分分析した。算出された主成分が資料の情報をどれくらい説明しているかの目安を与える、すなわち主成分の妥当性を表す寄与率を見ると、第 1 主成分は 7 個ある資料のうち約 4.4 個の情報すなわち資料の本質の約 63% を説明しており、第 2 主成分は約 1.2 個の情報すなわち資料の本質の約 17% を説明していることが認められ、この 2 つの主成分で資料の本質の 80% 以上が説明されることがわかる。算出された第 1 および第 2 主成分の式を視覚化した図である変量プロットを見ると、第 1 主成分は各変量の係数全てが正に出ていることから心筋細胞の分化の指標となることが考えられる。GATA4、MEF2C および Nkx2.5 は心筋細胞分化の比較的初期に発現が見られるマーカーであり、心筋線維

遺伝子の MLC2a、MLC2v、 α MHC、 β MHC は心筋細胞分化の比較的後期に発現が見られることが知られている。なかでも β MHC はマウスでは胎生期の心筋に発現し、出生後は α MHC に置換される。第 2 主成分では GATA4、MEF2C および Nkx2.5 の係数は負の値であり、心筋線維遺伝子の係数はすべて正の値である上、 β MHC が α MHC よりも低い係数を割り当てられていることから、第 2 主成分は心筋細胞の成熟の指標となることが考えられる。本研究では分化誘導後における自律拍動する小結節出現までの日数および出現した小結節の数に加え、この第 1 主成分の得点を心筋細胞分化能の指標とした。

次に分化前の遺伝子発現を評価するために、マイクロアレイによる解析を行った。得られたデータにフィルターをかけて心筋細胞分化能との相関のあるものを検出した。まず、遺伝子の発現が見られる Probe Set を選ぶためにフィルター①をかけた。次に、細胞株による遺伝子発現の差を比較するためには細胞株間で差があるものを選ぶ必要があるためフィルター②をかけた。その次に、細胞株間での差が小さいと相関がないものまで相関があるとして検出されてしまう危険性があるので細胞株間での差が平均で 50% ずつあれば大きな差が出ると仮定、すなわち最大の平均値と最小の平均値に 2.5 倍の差があればよいと仮定しフィルター③をかけた。最後に、フィルター④をとして定量性リアルタイム RT-PCR で得られた第 1 主成分の最大値、第 2 主成分の最大値、さらに自律拍動する小結節出現までの日数、自律拍動する小結節数に対してスピアマンの順位相関係数を算出し、有意な相関があるものを選び出した。ここで、相関係数として順位相関を選択した理由は、分化前における特定の遺伝子発現が心筋細胞分化に影響する場合、分化前の遺伝子発現量と分化効率は必ずしも線形の相関を示すとは限らないためであり、また、いくつかの飛離れた値が存在する場合には、例えば相関が線形であったとしても、ピアソンの積率相関係数などの間隔尺度・比

尺度間の相関係数の場合はそれらの値に引きずられて不当に高い相関係数が得られてしまうからである。

この結果、Table 2 に示すような 24 遺伝子が検出された。このうち、CMP2 と CMP13 は 2 種類のプローブセットで検出されており、心筋細胞分化との相関関係については信頼度が特に高いと考えられた。

D-2 CMP 遺伝子と心筋細胞分化との因果関係の評価

CMP 遺伝子は未分化細胞の心筋細胞分化能と相関関係が認められるが、これらが実際に心筋細胞分化に関与しているという因果関係を説明するには、相関関係のみでは不十分であるといえる。そこで、筆者らは RNAi を用いて、各 CMP 遺伝子の機能を阻害し、心筋細胞への分化に影響を与えているかどうかを評価することを試みた。RNAi を用いて、各 CMP 遺伝子をノックダウンした結果、CMP11、CMP19、CMP22 を除く全ての遺伝子で、有意な発現の抑制が認められた。

Table 3 より、CMP1、CMP2、CMP3、CMP4、CMP5、CMP6、CMP8、CMP9、CMP10、CMP13、CMP18、CMP20、CMP24 は、その機能を阻害することにより心筋細胞分化が抑制され、逆に、CMP7、CMP12、CMP16、CMP17、CMP21、CMP23 は、その機能を阻害することにより、心筋細胞分化が促進されることが明らかとなった。これらの結果より、上記遺伝子は心筋細胞分化過程において有意な生理的役割を担っていることが示唆される。

ここで、心筋細胞分化能の指標となる第 1 主成分との相関性を考えてみると、正の相関が得られた遺伝子、すなわち、心筋細胞に分化しやすいものほど発現が多いものは、分化を促進する方向に働き、その発現を抑制することで、分化が抑制されると考えられる。逆に、負の相関が得られたものは、心筋細胞に分化しにくいものほど発現が多く、分化を抑制する方向に働き、発現の抑制によ

り分化が促進されると考えられる。これを基に、Table 2 と Table 3 を比較してみると、CMP6、CMP7、CMP8、CMP9、CMP12、CMP16、CMP21、CMP24 においては、相関関係と RNAi を用いて機能を阻害した結果は矛盾しているように見える。しかし、心筋細胞分化に寄与することが既に知られている遺伝子の中には Wnt や BMP のように心筋細胞分化過程の特定のタイミングで一過性に機能が調節されることが必要な遺伝子も存在する。従って、RNAi を用いて遺伝子の機能を比較的長期に抑制した場合と、特異的なブロッカー等を用いて一過性に抑制した場合とでは、分化への影響が異なる可能性があり、今後、詳細な検討が必要である。

CMP23 は、その機能の阻害により、自律拍動する小結節数、および、心筋細胞特異的マーカー遺伝子の α MHC、 β MHC、MLC2v は有意な増加が認められた。それにも関わらず、MLC2a は有意な減少が認められた。心房筋を特徴付ける MLC2a が減少し、心室筋を特徴付ける MLC2v が増加したことは、心室筋の特異的な誘導に重要な因子であることが示唆され、心不全の治療に有用な情報と考えられる。

E. 結論

細胞の心筋分化活性の指標となるマーカーの探索はこれまでも国内外で盛んに行われている。心筋分化活性の指標となるマーカーは、高い心筋分化能を有する未分化細胞を分離する技術、さらには特異的かつ効率的な心筋細胞分化誘導技術への応用につながる。しかしながら、未分化段階も含めた分化過程において用いる、細胞の心筋分化活性の指標となるマーカーは依然として存在していない。従来の研究では、未分化細胞に対して心筋分化誘導刺激を施した後、分化過程の初期に発現が変動する遺伝子を探索する手法が取られていた。このため、得られたマーカーは「既に開始してしまった心筋細胞分化の初期過程」のマーカーではあっても、分化誘導前の「未分化細胞

が有する心筋細胞への分化活性」についてのマーカーではない。心疾患の適切な治療のためには、未分化細胞の品質評価および心筋分化能の高い未分化細胞の分離が必要とされる。したがって、未分化段階も含めた分化過程において、細胞の心筋分化活性の検出に用いることが可能なマーカーが依然として求められている。本研究において筆者らは、未分化段階を含む分化過程において、細胞における複数の特定遺伝子 (CMP 遺伝子群) の発現量が、細胞の心筋分化活性と有意な相関を示すという知見を得た。これと同時に、本研究で検出された複数の CMP 遺伝子の中には、未分化細胞の心筋細胞への分化において有意な生理的役割を果たしているものが存在することが示唆された。これらのことから、CMP 遺伝子およびその遺伝子産物をマーカーとして用いることにより、細胞の心筋分化活性を的確に検出することができる可能性があると考えられた。しかし、CMP 遺伝子が P19 系列以外の未分化細胞・幹細胞あるいは他の動物種でも同様の機能を果たすか、また、各 CMP 遺伝子の心筋細胞分化に対する詳細な機能については、多くが不明でありさらなる検討が必要である。先端医薬品である細胞治療薬の品質と再生医療の有効性・安全性を確保するのはフロンティア領域であるがゆえに未知の要素が多く単純ではない。重症心不全に対するより良い治療法の確立のために本研究の進展を含め、今後さらなる多角的な研究が必要とされる。

F. 健康危険情報

遺伝子組み換え実験については、研究開発等に係る遺伝子組み換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令並びに国立医薬品食品衛生研究所「遺伝子組換え安全管理規則」に則って実施した。

G. 研究発表

G-1 研究論文

Onohara N, Nishida M, Inoue R, Kobayashi H, Sumimoto H, Sato Y, Mori Y, Nagao T, Kurose H. TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *EMBO J.* 2006;25:5305-16.

Nagamatsu Y, Nishida M, Onohara N, Fukutomi M, Maruyama Y, Kobayashi H, Sato Y, Kurose H. Heterotrimeric G protein G α 13-induced induction of cytokine mRNAs through two distinct pathways in cardiac fibroblasts. *J Pharmacol Sci.* 2006;101:144-50.

Yoshida T, Inoue R, Morii T, Takahashi N, Yamamoto S, Hara Y, Tominaga M, Shimizu S, Sato Y, Mori Y. Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nature Chem Biol.* 2006;2:596-607.

Suzuki T, Nishimaki-Mogami T, Kawai H, Kobayashi T, Shinozaki Y, Sato Y, Hashimoto T, Asakawa Y, Inoue K, Ohno Y, Hayakawa T, Kawanishi T. Screening of novel nuclear receptor agonists by a convenient reporter gene assay system using green fluorescent protein derivatives. *Phytomedicine.* 2006;13:401-11.

Tozaki-Saitoh H, Koizumi S, Sato Y, Tsuda M, Nagao T, Inoue K. Retinoic acids increase P2X2 receptor expression through the 5'-flanking region of P2rx2 gene in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Mol Pharmacol* 2006;70:319-28.

G-2 学会発表

長谷川哲也, 細野哲司, 佐藤光利, 山口照英, 佐藤陽治: DNA マイクロアレイを用いた心筋細胞分化予測指標の探索. 日本薬学会第 127 年会, 富

山 (2007 年 3 月)

田邊思帆里, 佐藤陽治, 鈴木孝昌, 長尾拓, 山口照英: ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の品質管理に関するゲノムプロファイリング. 日本薬学会第 127 年会, 富山 (2007 年 3 月)

Nishida M, Onohara N, Inoue R, Sumimoto H, Sato Y, Mori Y, Nagao T, Kurose H. TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. 第 80 回日本薬理学会年会, 名古屋 (2007 年 3 月)

Suda R, Onohara N, Sato Y, Nishida M, Kurose H. Inhibition of angiotensin II signaling by ATP-induced NFAT activation in cardiac fibroblasts. 第 80 回日本薬理学会年会, 名古屋 (2007 年 3 月)

Narita Y, Onohara N, Nishida M, Sato Y, Nagao T, Kurose H. Role of Galpha12/13 in angiotensin II-induced cardiac fibrosis in mice. 第 80 回日本薬理学会年会, 名古屋 (2007 年 3 月)

Sato Y, Hasegawa T, Hosono T, Satoh M, Yamaguchi T. Search for cardiomyogenesis marker genes in multipotent cells. 第 80 回日本薬理学会年会, 名古屋 (2007 年 3 月)

Tanabe S, Sato Y, Nagao T, Yamaguchi T. Analysis for quality control markers in gene expression profiles of human bone marrow mesenchymal stem cells. 第 80 回日本薬理学会年会, 名古屋 (2007 年 3 月)

鈴木孝昌, 欒洋, 田邊思帆里, 佐藤陽治, 小木美恵子, 山口照英: ヒト間葉系幹細胞培養時の染色体安定性の解析. 第 6 回日本再生医療学会総会, 横浜 (2007 年 3 月)

田邊思帆里, 佐藤陽治, 山口照英: ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の培養状態に関わる品質特性指標の探索. 第6回日本再生医療学会総会, 横浜 (2007年3月)

佐藤陽治, 田邊思帆里, 山口照英: トランスクリプトーム解析によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の品質特性の探索. 第6回日本再生医療学会総会, 横浜 (2007年3月)

長谷川哲也, 細野哲司, 佐藤光利, 山口照英, 佐藤陽治: 未分化細胞における心筋分化予測マーカー遺伝子の探索. 第6回日本再生医療学会総会, 横浜 (2007年3月)

Tanabe S, Yamaguchi T, Nagao T, Sato Y: Passage-dependent alterations in gene expression profiles of human bone marrow mesenchymal stem cells. 日本分子生物学会2006フォーラム, 名古屋 (2006年12月)

Kurose H, Suda R, Tanabe S, Onohara N, Mangmool S, Nagamatsu Y, Sato Y, Nagao T, Nishida M. Rac up-regulates angiotensin II type I receptors through ROS and NF-kappaB-dependent interleukin-1beta production in rat cardiac fibroblasts. The American Heart Association Scientific Sessions 2006, Chicago, USA (2006年11月)

Satoh M, Nakamura R, Fujishita K, Mori S, Ishida S, Yamaguchi T, Inoue K, Ohno Y, Nagao T, Sato Y. Thyroid Hormone Suppresses Calcification of Blood Vessel through Matrix Gla Protein. The 5th Joint Seminar, Kunming, China (2006年10月)

Tozaki-Saito H, Tsuda M, Inoue K, Koizumi S, Shinozaki Y, Sato Y. Upregulation of microglial

P2X4 receptors by retinoic acid. Neuroscience 2006, the 36th annual meeting of Society for Neuroscience, Atlanta, USA (2006年10月)

Satoh M, Nakamura R, Fujishita K, Mori S, Ishida S, Yamaguchi T, Inoue K, Ohno Y, Nagao T, Sato Y. Prevention of vascular smooth muscle calcification by thyroid hormone. The XVth International Congress of Pharmacology, Beijing, China (2006年7月)

H. 知的財産権の出願・登録

H-1 特許取得

特願 2006-109854 「細胞の心筋細胞分化活性検出用マーカー」出願日:平成18年4月12日、発明者:佐藤陽治、長谷川哲也、山口照英、細野哲司、佐藤光利

H-2 実用新案登録 なし

H-3 その他 該当事項なし

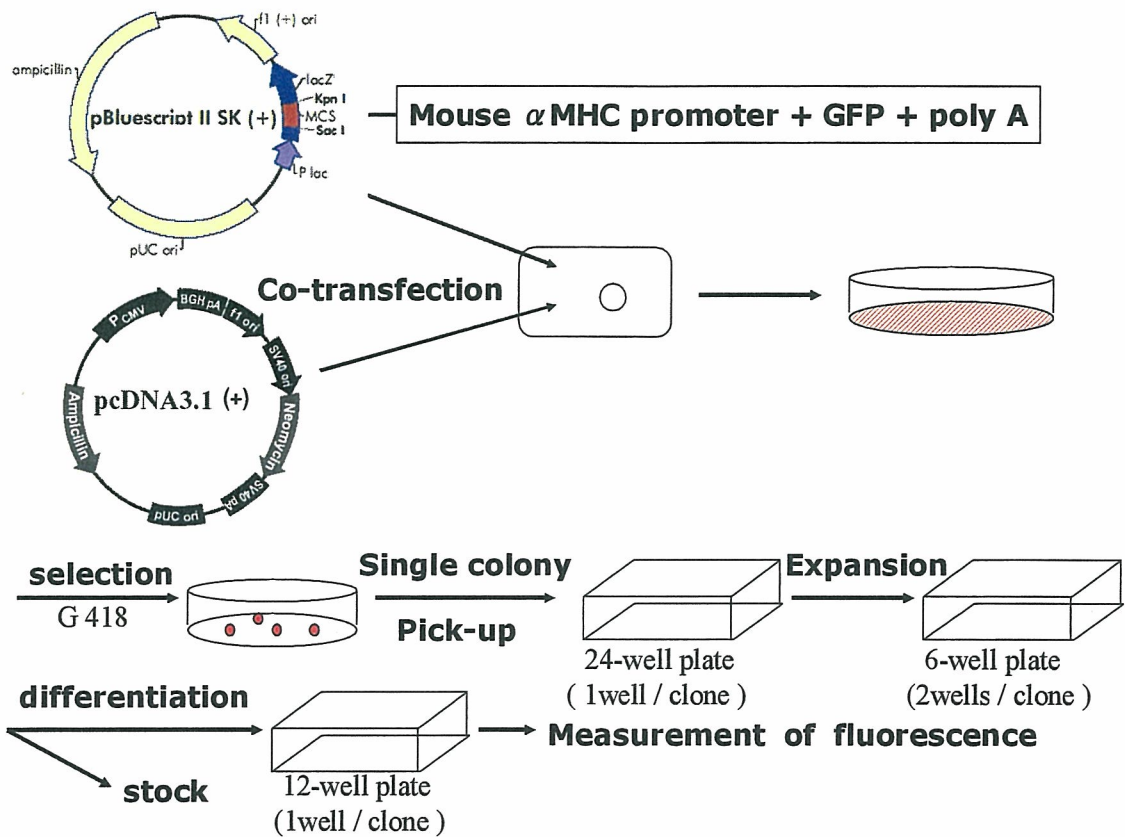


Fig.1 CL6 由来細胞株の作製

本研究で用いた CL6 由来細胞株である CL6G26、CL6G36、CL6G45、CL6G52 は、以上のようにして作製されたものである。 α MHC: alpha myosin heavy chain; GFP: green fluorescent protein; poly A: human growth hormone poly A signal; G418: Geneticine

Table 1 心筋細胞特異的マーカー遺伝子測定用のプライマーおよびプローブの配列

Gene	Name	Sequence
Nkx2.5	TaqMan probe mNkx2.5_T	TGCTGAAGCTCACGTCCACGCAG
	Forward primer mNkx2.5_F	CTTCAAGCAACAGCGGTACCT
	Reverse primer mNkx2.5_R	CGCTGTGCTTGCACCTTGTA
GATA4	TaqMan probe mGATA4_T	TGCATCTCCTGTCACTCAGACATCGCA
	Forward primer mGATA4_F	TGCTCTAAGCTGTCCCCACAA
	Reverse primer mGATA4_R	GTGATTATGTCCCATGACTGTCA
MEF2C	TaqMan probe mMEF2C_T	CCAGTTACCATCCCAGTGTCCAGCCATAAC
	Forward primer mMEF2C_F	TCCACCTCCCAGCTTTGAGAT
	Reverse primer mMEF2C_R	TGACAGGATTGCTGTACACCAAAC
MLC2a	TaqMan probe mMLC2a_T	AAGGCCTTCAGCTGCATTGACCAGAAC
	Forward primer mMLC2a_F	AAGCCCAGATTCAGGATTCAAG
	Reverse primer mMLC2b_R	AGCTCTTCCTCCGGAACACTT
MLC2v	TaqMan probe mMLC2v_T	CATGGACCAGAACAGAGACGGCTTCA
	Forward primer mMLC2v_F	GGAGTTCAAGGAAGCCTTCACA
	Reverse primer mMLC2v_R	TGTGTCCCTTAGGTCATTCTTGTC
α MHC	TaqMan probe m α MHC_T	TCTGCTGATACCGGTGACAGTGGTAAAGG
	Forward primer m α MHC_F	CATGGCTACACTCTTCTCTACCTATGC
	Reverse primer m α MHC_R	GGTGGAGAGCAGACACTGTTTG
β MHC	TaqMan probe m β MHC_T	ACCCCTACGATTATGCGTTCATCTCCCAA
	Forward primer m β MHC_F	TTTCTACCAAATCCTGTCTAATAAAAAGC
	Reverse primer m β MHC_R	GTCATCAATGGAGGCCACAGT

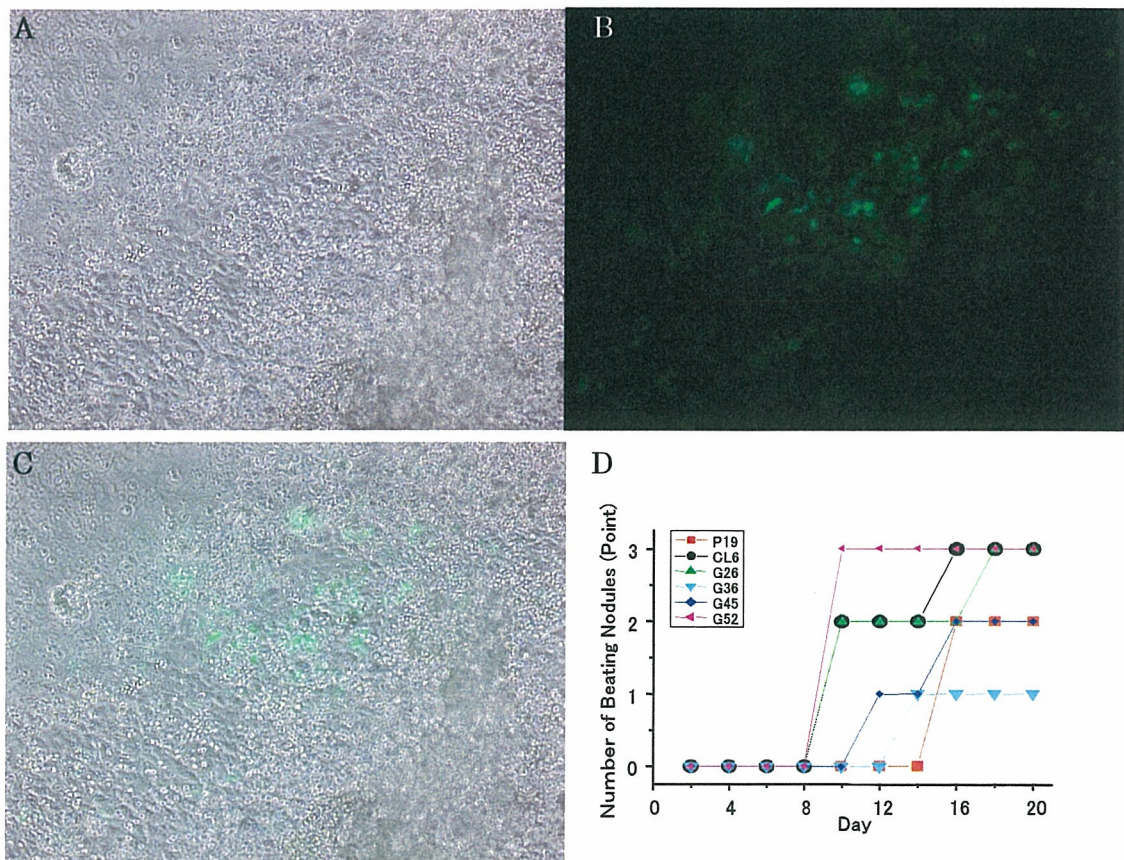


Fig.2 P19 由来細胞の心筋細胞分化

CL6G52 細胞の心筋細胞分化 (×10、BZ-8000 (KEYENCE)を用いて撮影した)

A: 分化誘導後 8 日目。自律拍動する小さな結節が認められた。

B: A と同部位の蛍光像。GFP の発現が認められ、心筋細胞に分化していることが確認された。

C: A と B との重ね合わせ像。

D: P19 由来細胞株の心筋細胞分化の定性的時間経過。各細胞株の自律拍動する小結節数の時間経過を示す。小結節が見られないものを「0」、6 穴細胞培養プレート 1 枚に対して 1 つ以上の小結節があるものを「1」、プレートのウェル 1 つに対して 1 つ以上の小結節があるものを「2」、顕微鏡の視野(×200)に対して 1 つ以上の小結節があるものを「3」とした。

