

200706006A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療等研究事業

心筋組織再生のための集約的研究

(H17- 再生 -007)

平成 19 年度 総括研究報告書

主任研究者 小室 一成

平成 20 年 (2008) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	
心筋組織再生のための集約的研究-----	1
小室 一成	
II. 分担研究報告書	
1. 心筋幹細胞の分化誘導と不全心への移植に関する研究-----	8
永井 敏雄	
2. 心筋分化誘導因子の単離同定に関する研究-----	10
南野 徹	
3. 間葉系細胞の心筋分化誘導と不全心への移植に関する研究-----	11
梅澤 明弘	
4. 移植組織の血管新生についての研究-----	15
望月 直樹	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	17
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	21

厚生労働科学研究費補助金（再生医療等研究事業）
総括研究報告書

心筋組織再生のための集約的研究

主任研究者 小室一成 千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学 教授

研究要旨 骨髄間葉系細胞、心筋幹細胞を心筋細胞に分化誘導する因子と、血管新生を促進する因子の解明を目的とした本研究において、我々は、マイクロアレイ法を用いて心筋分化が可能な間葉系細胞株に特異的に発現している遺伝子である Gremlin (Grem1、骨形成因子BMPアンタゴニスト)を同定し、Grem1が誘導開始直後の BMPsを阻害することで心筋分化を促進することを明らかにした。また、OP9細胞から分泌される心筋分化誘導因子、X因子がES細胞においても心筋分化に必須の蛋白であることを明らかにし、X因子の受容体を同定した。心筋細胞と毛細血管の内皮細胞間の相互調節（内皮細胞由来のNeuregulinの心臓への、心筋細胞由来のangiopoietinの内皮細胞への作用）が心臓の機能調節に重要であることを明らかにした。また、内在性の心臓SP細胞の傷害心筋での動態を解析し、心筋梗塞時に心臓SP細胞は canonical Wnt signalを介して細胞周期に入り増殖することを明らかにした。

(主任研究者)

小室 一成 千葉大学大学院医学研究院
循環病態医科学教授

(分担研究者)

永井 敏雄 千葉大学大学院医学研究院
循環病態医科学 講師

南野 徹 千葉大学医学部附属病院
循環器内科 助教

梅澤 明弘 国立成育医療センター研究所
部長

望月 直樹 国立循環器病センター研究所
部長

GeneChipの結果を解析した。さらに発現の近い細胞同士をグループ化し、統計解析ソフトNIA array解析で処理することで、心筋分化が可能な細胞群特異的な遺伝子を選出した。

2) 心筋分化誘導因子Grem1の誘導能の評価

Grem1の心筋分化能の評価は、P19CL6細胞を用い、Grem1を添加時の動画撮影による拍動面積の測定、RT-PCR法による遺伝子発現の有無、免疫組織化学染色法によるタンパク質発現を、それぞれ評価した。またGrem1の添加期間を振って、最も高い心筋誘導能を示す時期を免疫組織化学染色法で評価した。

3) BMP2タンパク質による心筋分化阻害

分化誘導初期にリコンビナントヒトBMP2タンパク質をP19CL6細胞に添加し、RT-PCR法による遺伝子発現、免疫組織化学染色法による心筋特異的なタンパク質の有無を、それぞれ評価した。

4) BMP2タンパク質によるBmp2/4遺伝子発現抑制とBMP活性の経時的な変化

リアルタイムRT-PCR法を用いて、各条件で分化誘導したP19CL6細胞のBmp2/4遺伝子発現量の変化を経時的に測定した。同様にBMP活性値を測定できる *Id1* promoter-Luxプラスミドを用いたリポーターアッセイ法で、同活性値の変化を経時的に測定した。

5) BMP2タンパク質によるWnt3a遺伝子発現抑制とWnt活性の経時的な変化

A. 研究目的

心不全・心筋梗塞の新しい治療法として再生治療が注目されている。現在、骨格筋芽細胞、骨髄細胞、内皮前駆細胞による細胞移植が臨床試験中であるが、臨床的に十分な数の心筋細胞と血管の両者を再生する方法は確立されていない。本研究では骨髄間葉系細胞、心筋幹細胞を心筋細胞に分化誘導する因子と、血管新生を促進する因子を単離精製し、非侵襲的な心血管分化誘導療法の確立を目的とする。

B. 研究方法

間葉系幹細胞

1) 心筋分化誘導因子の同定

GeneSpringソフトウェアを用いて、当研究室で樹立した細胞と、NCBIのGeneChipデータベースであるGEO datasetsから取得した69種類のヒト

リアルタイムRT-PCR法を用いて、各条件で分化誘導したP19CL6細胞のWnt3a遺伝子発現量の変化を経時的に測定した。同様にWnt活性値を測定できるTOPflashプラスミドを用いたりポーターアッセイ法で、同活性値の変化を経時的に測定した。

OP9培養上清中に存在する心筋細胞分化誘導因子の機能の解明

昨年度までの研究で、分担研究者らはOP9細胞の培養上清中に存在する心筋分化誘導因子(X因子)を単離同定し、この因子がP19CL6細胞において心筋分化に必須の蛋白であることを明らかにした。今年度はES細胞においてX因子をノックダウンし、その役割を検討した。また、候補遺伝子アプローチによりX因子の受容体候補分子を選定し、実際にX因子がこの受容体に結合するかについて検討した。

血管新生

1) 心筋の発生に重要なErbB受容体の下流で機能する分子Gabファミリー分子のノックアウトマウスの作製による心筋-内皮細胞間シグナルの理解

心筋細胞の機能維持にはErbBファミリーチロシンキナーゼ受容体のシグナルが重要であることが示されている。心筋再生にもErbBファミリー受容体のシグナルは不可欠であると予想した。これまでに心臓の保護作用に必須であるErbBと、gp130の両者の下流で機能するアダプター分子Gabファミリー分子を心臓で特異的に欠損させたマウスを作製した。

- (1) alpha-Myosin Heavy Chain Promoter-Cre (aMHC-Cre) マウスの入手
 - (2) conventional Gab2 KOマウス
 - (3) conditional Gab1 KO マウスの作製 (floxed Gab1)
- のマウスをCre/loxPシステムを用いて心臓でGab1を欠損させるように計画し、さらにGab2 KOマウスとの交配をおこなった。以上により、4群のマウスを作製した。
- ① control マウス-control
 - ② 心臓特異的Gab1 KOマウス-Gab1CKO
 - ③ 全身Gab2欠損マウス-Gab2KO
 - ④ 心臓でGab1 Gab2欠損マウス-DoubleKO (②と③の交配による。)

2) 骨髄間葉系細胞に発現する機能未知分子PTKの心臓分化における機能の解析

これまでにPTK7が骨髄間葉系細胞に発現することをsignal sequence trapでとらえていた。心

臓に分化することがよく知られているP19細胞でのPTK7の発現を検討した。

心臓SP細胞

1) 心臓SP細胞の単離

10-12週齢のマウス心臓より酵素消化法により細胞を単離し、ヘキスト33342により染色した後、fluorescent cell sortingを行い色素染色性の低いSP細胞と非SP細胞を分取した。マウス心筋梗塞モデルは左前下行枝を結紮して作成した。

2) 免疫染色

単離した心臓SP細胞をcytospin3 (Thermo社)により圧着して固定後、β-カテニンの発現と核内移行について免疫蛍光染色法により定量的に評価した。

3) 定量的PCR

心臓SP細胞よりRNAを抽出後、LightCycler TaqMan Master Kit (Roche Applied Science社)を用いて行なった。解析はLightCycler Software ver. 3.5 (Roche社)を用いてSecond Derivative Maximum法にて定量分析した。

(倫理面への配慮)

ヒト細胞の培養に関しては、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている(国立成育医療センター研究所、受付番号25、26及び27、平成15年1月承認、受付番号49、平成15年10月承認、受付番号55、平成15年11月承認、受付番号88、89、90、91平成16年7月承認、受付番号55、平成16年11月追加承認、受付番号146、平成17年4月承認、受付番号156、平成17年7月承認)。また、倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針(未定稿)」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮し研究を行った。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないよう、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行っている。

実験動物を用いる研究については、千葉大学、国立循環器病センターおよび国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する(承認番号2003-002, 2005-003)。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこない、実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行った。

C. 研究結果

間葉系幹細胞

GeneSpringソフトウェアを用いて、69種類のヒトGeneChipを解析して分類した30グループのうち、21グループは、心筋分化が可能な細胞群であり、2つの遺伝子を選択できた。このうちのひとつが今回選択したGremlin (Grem1) 遺伝子だった。

CL6細胞にGrem1 (125 ng/ml) をDMSOとともに培地中に添加したところ、DMSOのみ添加した場合に比べて誘導開始14日目の拍動面積の顕著に増加できることを明らかにした。またRT-PCR法による遺伝子発現を調べたところ、先程同様にDMSOにGrem1を添加することで心筋細胞特異的な転写因子、構造タンパク質、ホルモンの発現が上昇することを明らかにした。さらに免疫組織化学染色法でも心筋特異的なタンパク質であるトロポニンTタンパク質やミオシン重鎖の発現がGrem1の添加によって発現量が上昇することを明らかにした。その一方で、Grem1単独では、P19CL6細胞に心筋特異的な遺伝子やタンパク質が一切発現しなかった。次に、Grem1が最もCL6細胞の心筋分化に寄与する期間を調べたところ、誘導開始1日目から3日目の添加が一番高い誘導能を示した。

BMP2タンパク質は、心筋分化を誘導するサイトカインとして知られており、心筋分化誘導実験でよく用いられている。今回、GeneChipの解析結果より選出したGrem1は、BMP2/4/7のアンタゴニストであり、BMPシグナルを阻害する。しかし、誘導開始1日目から3日目に添加することで心筋分化誘導率を上昇させる能力を持つことから、この誘導開始1日目から3日目のBMPシグナルは心筋分化を抑制している可能性がある。そこで、P19CL6細胞にBMP2タンパク質を誘導開始1日目から3日目に添加したところ、心筋特異的転写因子やタンパク質の発現が極端に減少しており、心筋分化を阻害することが明らかとなった。また同細胞にBMP2タンパク質を誘導開始4日目から14日目に添加したところ、心筋特異的タンパク質を発現した。

誘導開始1日目から3日目にBMP2タンパク質を添加したP19CL6細胞は、Bmp2/4遺伝子の発現が抑制されていた。またBMPシグナルも検出できなかった（ただしBMP2タンパク質を添加した3日目だけはBMPシグナルを検出できた）。一方で、同時期にBMP2タンパク質を添加しなかったP19CL6細胞は、Bmp2/4遺伝子は誘導開始3日目から14日まで発現しており、同期間のBMPシグナルも検出できた。

胚性細胞の心筋分化には、誘導開始直後にWntシグナルが必要となる。誘導開始1日目から3日目にBMP2タンパク質を添加したP19CL6細胞は、

Wnt3a遺伝子の発現が抑制されていた。またWntシグナルも検出できなかった。一方で、同時期にBMP2タンパク質を添加しなかったP19CL6細胞は、Wnt3a遺伝子を1日目から3日目まで発現しており、Wntシグナルも3日目から5日目まで検出できた。

OP9培養上清中に存在する心筋細胞分化誘導因子の機能の解明

ES細胞においてX因子をノックダウンしたところ、野生型ES細胞ではhanging drop法によって心筋細胞への分化が認められたが、X因子をノックダウンしたES細胞では心筋細胞への分化が著明に抑制された。また、候補遺伝子アプローチによりX因子の受容体を想定し、ヨードラベルしたX因子との結合を検討したところ、X因子との特異的結合が観察され、この蛋白がX因子の受容体である可能性が示唆された。

血管新生

(1) 計画にそって作成した4群のマウスがメンデルの法則に従って誕生することから胎生致死ではないことがまず確認された。

(2) 心臓のGab1ファミリー分子のリン酸化を誘導するのが、EGFファミリー分子のなかでもこれまで重要と考えられてきたHB-EGFではなく、Neuregulin-ErbB2/4系であることをマウス、培養心筋細胞で明らかにした。

このNeuregulin刺激で心臓のERKならびにAKTの活性化を検討したところ、DKOマウスでのみERK、AKTの活性化が抑制されていた。DKOマウスのみ、生後から著明な心拡大と心臓内膜の線維化を認められた。これに矛盾しない結果として心臓の超音波検査と心臓のカテーテル検査で心機能低下を確認した。心臓内膜の線維化はエラスチンとコラーゲンの顕著な蓄積の結果であった。心臓内の血管数を定量化したところ、最小血管数の現象を認め、異常に拡張した内皮細胞だけで血管平滑筋層を伴わない異常な血管も多数認められた。

以上の結果から心筋内のシグナルだけでなく心臓からの内皮細胞のなんらかの栄養因子の欠落により内皮細胞系の異常をきたしていると予想し、microarrayを行った。その結果DKOではangiopoietinの遺伝子発現が著明に低下していることがわかった。

PTKの機能解析に着いては、anti-PTK抗体を製作した。この抗体の特異性を確認し、P19CL9細胞をDMSOで分化誘導後数日でのPTKの発現を調べたところ、誘導2-3日目で数倍の発現を認めた。

心臓SP細胞

心臓SP細胞はsham→0.4%、心筋梗塞1日→0.2%、3日後→1.6%、7日後→1.0%であり、梗塞3日後はshamに比較して有意に増加した。免疫染色法によるβ-カテニンの発現解析をshamおよび心筋梗塞3日目の心臓SP細胞について検討した結果、β-カテニン陽性細胞はsham45%、梗塞マウス73%であった。また、shamおよび心筋梗塞3日目の心臓SP細胞の、それぞれ3%、6%にβ-カテニンの核内移行が認められた。また、GSK-3β抑制薬 BIO を心筋梗塞作成直後と3日目に腹腔内投与した場合、心臓SP細胞の72%にβ-カテニンの発現が、また、25%にβ-カテニンの核内移行が認められた。定量的PCR法による遺伝子発現解析の結果、sham心臓SP細胞ではCyclinD1、Axin2、c-Mycの遺伝子発現は認められなかったが、梗塞3日目の心臓SP細胞では発現が認められた。また、BIOを投与した梗塞マウスの心臓SP細胞では、CyclinD1、c-Mycの発現が非投与梗塞マウスに比較して→1.6倍増加した。以上の結果から、心筋梗塞時に心臓SP細胞にはcanonical Wnt signalを介した細胞増殖シグナルが作用し、GSK-3βを抑制してcanonical Wnt signalを促進することにより増殖活性を亢進させることが示唆された。

D. 考察

今回のバイオインフォマティクスを応用した心筋分化可能な細胞群特異的な遺伝子の選択方法は、有用であることが明らかとなった。この方法は様々な応用が利くために、心筋分化因子以外の因子の選択も可能である。また誘導開始初期のBMPタンパク質はWntシグナルを阻害することも明らかになったことからこの両者には何らかの相互作用があることも予測される。

X因子がES細胞において心筋分化に必須の蛋白であることが明らかになった。また、X因子の細胞表面受容体と思われる蛋白の同定にも成功した。今後は、これらの結果をもとにして、X因子が心筋分化誘導をおこす分子機構についての解析をさらに進めていくことを予定している。また、X因子、およびX因子と他の増殖因子の組み合わせによる高効率の心筋分化誘導法の確立を目的とした研究も進めていく予定である。

心臓の収縮機能、生存機能維持にはErbBファミリー分子が重要でありその下流のアダプター分子Gabがの心機能維持における重要性をまず示した。血管内皮細胞から分泌されるNeuregulinがErbBの活性化因子として特に心筋では重要であることも突き止めた。また、Gab欠損により心筋細胞からのangiopoietinの発現が著明に低下しているためにangiopoietinの受容体を発現する

心臓内皮細胞、血管内皮細胞の変化をきたしている可能性が予想された。その予想に一致して内膜の線維化ならびに、血管数の現象・異常血管の出現を認めた。以上の結果から心筋細胞と毛細血管の内皮細胞間の相互調節（内皮細胞からのNeuregulinが心臓へ、心筋細胞からangiopoietinが内皮細胞へ作用）が、心臓の機能調節に重要であることを突き止めた。

昨年までに心筋細胞への分化が示されている骨髄間葉系細胞に発現するPTK7分子を同定していたが、機能未知であった。このため、まず心臓への分化にしたがって発現が変化するか否かを検討したところ、心臓の分化前、誘導とともに発現が明らかに増加することから、心臓への分化に重要な分子である可能性が考えられた。

臓器幹細胞は静止期にあり、増殖活性は制御されている。我々の検討でも心臓SP細胞は骨髄SP細胞と同様にG0期の細胞が高率に存在した。また、内在性の心臓幹細胞の病態時におけるin vivoでの増殖・分化の挙動に関しては明らかにされていない。本研究において、心筋梗塞時にはcanonical Wnt signalを介して心臓SP細胞は細胞周期に入り、増殖することが示唆された。今後、梗塞急性期において、内在性の心臓SP細胞、および、心臓SP細胞にWnt signalを供与する細胞の局在と動態を解析することが不可欠である。

E. 結論

Gremlinは、P19CL6細胞に誘導開始初期に添加すると心筋分化を促進できた。また、心筋分化因子として知られているBMP2タンパク質は誘導開始初期には心筋分化を抑制した。これらのことは、再生医療としての心筋分化細胞の臨床応用化にも役立つ。心筋分化を行なう際、分化させたい細胞の分化ステージを確認し、そのステージに適した分化誘導を行なうことで誘導率の上昇が見込めるからである。例えば、ヒトES細胞やヒトiPS細胞といった胚性細胞の場合は、誘導開始直後にBMPタンパク質を添加すると心筋分化を抑制する可能性がある。その一方で、間葉系幹細胞といった細胞の場合、Gremlinを添加しても心筋分化抑制作用しか示さないことも予想される。

OP9細胞から分泌される心筋分化誘導因子（X因子）はES細胞の心筋分化に必須の蛋白であることが明らかになった。また、X因子の受容体の同定にも成功し、X因子が心筋分化誘導をおこす分子機構についてその一端を明らかにした。

内皮細胞からのNeuregulinの心臓への、心筋細胞からのangiopoietinの内皮細胞への作用が心臓の再生のためのシグナルとして重要であるこ

とがわかった。

内在性の心臓SP細胞の傷害心筋での動態を解析し、心筋梗塞時に心臓SP細胞はcanonical Wnt signalを介して細胞周期に入り増殖することが示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Sano, M., Minamino, T., Toko, H., Miyauchi, H., Orimo, M., Qin, Y., Akazawa, H., Tateno, K., Kayama, Y., Harada, M., Shimizu, I., Asahara, T., Hamada, H., Tomita, S., Molkenstein, J. D., Zou, Y., Komuro, I. p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature* 446:444-448, 2007.
- van den Boom, V., Kooistra, S. M., Boesjes, M., Geverts, B., Houtsmuller, A. B., Monzen, K., Komuro, I., Essers, J., Drenth-Diephuis, L. J., Eggen, B. J. UTF1 is a chromatin-associated protein involved in ES cell differentiation. *J Cell Biol* 178:913-924, 2007.
- Miyagawa Y, Okita H, Nakajima H, Horiuchi Y, Sato B, Taguchi T, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata JI, Umezawa A, Kiyokawa N. Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells. *Mol Cell Biol*. in press
- Yazawa T, Uesaka M, Inaoka Y, Mizutani T, Sekiguchi T, Kajitani T, Kitano T, Umezawa A, Miyamoto K. Cyp11b1 is induced in the murine gonad by luteinizing hormone/ human chorionic gonadotropin and involved in the production of 11-ketotestosterone, a major fish androgen; conservation and evolution of androgen metabolic pathway. *Endocrinology*. in press
- Takeuchi M, Takeuchi K, Kohara A, Satoh M, Shioda S, Ozawa Y, Ohtani A, Morita K, Hirano T, Terai M, Umezawa A, Mizusawa H. Chromosomal instability in human mesenchymal stem cells immortalized with human papilloma virus E6, E7, and hTERT genes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 43(3-4):129-38. 2007
- Yoshida Y, Shimomura T, Sakabe T, Ishii K, Gonda K, Matsuoka S, Watanabe Y, Takubo K, Tsuchiya H, Hoshikawa Y, Kurimasa A, Hisatome I, Uyama T, Terai M, Umezawa A, Shiota G. A role of Wnt/beta-catenin signals in hepatic fate specification of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 293(5):G1089-98. 2007
- Sato B, Katagiri Y, Miyado K, Akutsu H, Miyashita Y, Horiuchi Y, Nakajima H, Okita H, Umezawa A, Hata J, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. Preferential localization of SSEA-4 in interfaces between blastomeres of mouse preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun*. 364:838-43. 2007
- Kato S, Mohri Y, Matsuo T, Ogawa E, Umezawa A, Okuyama R, Nishimori K. Eye-open at birth phenotype with reduced keratinocyte motility in LGR4 null mice. *FEBS Lett*. 581(24):4685-90. 2007
- Hashii N, Kawasaki N, Nakajima Y, Toyoda M, Katagiri Y, Itoh S, Harazono A, Umezawa A, Yamaguchi T. Study on the quality control of cell therapy products. Determination of N-glycolylneuraminic acid incorporated into human cells by nano-flow liquid chromatography/Fourier transformation ion cyclotron mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1160(1-2):263-9. 2007
- Toyoda M, Takahashi H, Umezawa A. Ways for a mesenchymal stem cell to live on its own: maintaining an undifferentiated state ex vivo. *Int J Hematol*. 86(1):1-4. 2007
- Shimomura T, Yoshida Y, Sakabe T, Ishii K, Gonda K, Murai R, Takubo K, Tsuchiya H, Hoshikawa Y, Kurimasa A, Hisatome I, Uyama T, Umezawa A, Shiota G. Hepatic differentiation of human bone marrow-derived UE7T-13 cells: Effects of cytokines and CCN family gene expression. *Hepatol Res*. 37(12):1068-79. 2007
- Okamoto K, Miyoshi S, Toyoda M, Hida N, Ikegami Y, Makino H, Nishiyama N, Tsuji H, Cui CH, Segawa K, Uyama T, Kami D, Miyado K, Asada H, Matsumoto K, Saito H, Yoshimura Y, Ogawa S, Aeba R, Yozu R, Umezawa A. Working" cardiomyocytes exhibiting plateau action potentials from human placenta-derived extraembryonic mesodermal cells. *Exp Cell Res*. 313(12): 2550-62. 2007
- Nishiyama N, Miyoshi S, Hida N, Miss, Uyama T, Okamoto K, Ikegami Y, Miyado K, Segawa K,

Terai M, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. The Significant Cardiomyogenic Potential of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells in Vitro. *Stem cells*. 25(8):2017-24. 2007

• Cui CH, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, and Umezawa A. Human dystrophin expression in the mdx mouse, a model of Duchenne muscular dystrophy, can be conferred predominantly by "cell fusion" with human menstrual blood-derived cells. *Mol Biol Cell*. 18(5):1586-94. 2007

• Umezawa A, Toyoda M. Two MSCs : Marrow stromal cells and mesenchymal stem cells. *Inflammation and Regeneration*. 27(1):28-36. 2007

• Yamada Y, Sakurada K, Takeda Y, Gojo S, Umezawa A. Single-cell-derived mesenchymal stem cells overexpressing *Csx/Nkx2.5* and *GATA4* undergo the stochastic cardiomyogenic fate and behave like transient amplifying cells. *Exp Cell Res*. 313 :698- 706. 2007

• Sugiki T, Uyama T, Toyoda M, Morioka H, Kume S, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Tsumaki N, Takahashi Y, Toyama Y, Umezawa A. Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with *KUM5* and *OP9* chondroblasts. *J Cell Biochem*. 100(5) :1240-54. 2007

Nakaoka Y, Nishida K, Narimatsu K, Kamiya A,

• Minami T, Sawa H, Okawa K, Fujio Y, Koyama T, Maeda M, Sone M, Yamasaki S, Arai Y, Koh GY, Kodama T, Hirota H, Otsu K, Hirano T, Mochizuki N. Gab family proteins are essential for postnatal maintenance of cardiac function through transmitting neuregulin-1/ErbB signaling. *J Clin. Invest* 117:1771-1181, 2007

• Seguchi O, Takashima S, Yamazaki S, Asakura M, Asano Y, Shintani Y, Wakeno M, Minamino T, Kondo H, Furukawa H, Nakamaru K, Naito A, Takahashi T, Ohtsuka T, Kawakami K, Isomura T, Kitamura S, Tomoike H, Mochizuki N, Kitakaze M. A cardiac myosin light chain kinase regulates sarcomere assembly in the vertebrate heart. *J Clin. Invest* 117; 2812-2824, 2007

• Myoishi M, Hao H, Minamino T, Watanabe K, Nishihira K, Hatakeyama K, Asada Y, Okada K, Ishibashi-Ueda H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML, Mochizuki N, Kitakaze M.

Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation* 116, 1226-1233, 2007.

• Min JK, Cho YL, Choi JH, Kim Y, Kim JH, Yu YS, Rho J, Mochizuki N, Kim YM, Oh GT, Kwon YG. Receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B ligand (RANKL) increases vascular permeability; Impaired permeability and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Blood* 109: 1495-1502, 2007.

• Takaya A, Kamio T, Masuda M, Mochizuki N, Sawa H, Sato M, Nagashima K, Mizutani A, Matsuno A, Kiyokawa E, Matsuda M. R-Ras regulates exocytosis by Rgl2/Rlf-mediated activation of RalA on endosomes. *Mol Biol Cell*. 18:1850-60, 2007.

2. 学会発表

• 小室一成: 心臓血管疾患に対する再生治療～期待される閉塞性動脈硬化症への有効性～. 日本赤十字医療センター院内講演会. 東京. 2007年4月7日.

• Komuro I: Cardiovascular Regeneration Therapy. Philippine Heart Association INC. Philippine College of Cardiology 38th Annual Convention & Scientific Meeting, Manila, Philippines, May 16-18, 2007.

• Komuro I: Cardiac side population cells. Cardiac Stems Cells: What we Need For Clinical Translation, Rome, Italy, June 37-28, 2007.

• Komuro I: Stem Cell Response to Growth Factors. 4th Annual Symposium of the American Heart Association Council on Basic Cardiovascular Science, Keystone, USA, July 30-August 2, 2007.

• 小室一成: Cardiac regeneration by Somatic Stem Cell. 第55回日本心臓病学会学術集会・日本心臓核医学会. 千葉. 2007年9月11日.

• 小室一成: 心臓は再生するのか? 阪大医療組織工学フォーラム. 大阪. 2007年12月11日.

• 小室一成: 心臓は再生するのか? 平成19年度再生医療等研究成果発表会. 東京. 2008年3月11日.

• 上大介、渡邊昌俊、梅澤明弘: GeneChipとNIA array analysisを用いた心筋形成因子の探索-胎児性癌細胞を拍動心筋に-、第28回日本炎症・再生医学会、東京、2007年8月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 特許取得

・「心筋細胞分化誘導促進剤及びその使用方法—
テルミサルタン、バルサルタンを用いる」

発明者：梅澤明弘、三好俊一郎、小川聡

出願日：特願2007-315920、平成19年12月6日

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財
団

・「心筋細胞分化誘導促進剤及びその使用方法—
ピオグリタゾンを用いる」

発明者：梅澤明弘、三好俊一郎、小川聡

出願日：特願2007-315921 平成19年12月6日

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財
団

2. 実用新案登録 該当なし

3. その他 該当なし

心筋幹細胞の分化誘導と不全心への移植に関する研究
分担研究者 永井敏雄 千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学 講師

研究要旨 成体の心臓には心筋幹前駆細胞として心臓side population (SP) 細胞が存在する。これまでに、心臓SP細胞はin vitroにおいて心筋細胞に分化し、また、移植された心臓SP細胞は傷害心筋にホーミング、分化することを報告した。本年度は、内在性の心臓SP細胞の傷害心筋での動態を解析し、心筋梗塞時に心臓SP細胞はcanonical Wnt signalを介して細胞周期に入り増殖することが示唆された。

A. 研究目的

近年、成体の心筋にも心筋幹/前駆細胞が存在することが報告されているが、その分化のメカニズム、in vivoでの動態は明らかではない。また、細胞移植療法に加えて、このような心筋幹細胞を心筋へ分化する因子を解明することは、移植療法の効率を高めるためにも重要である。本研究における分担研究者の目的は、ヒトからも採取可能な幹細胞分画である心筋side population細胞を単離し、分化誘導因子の探索、in vivoにおける役割について解明することである。本研究は細胞移植を基盤とした心筋再生療法の開発につながり、国民の福利厚生に寄与するものと考えられる。

B. 研究方法

1) 心臓SP細胞の単離

10-12週齢のマウス心臓より酵素消化法により細胞を単離し、ヘキスト33342により染色した後、fluorescent cell sortingを行い色素染色性の低いSP細胞と非SP細胞を分取した。マウス心筋梗塞モデルは左前下行枝を結紮して作成した。

2) 免疫染色

単離した心臓SP細胞をcytospin3 (Thermo社)により圧着して固定後、 β -カテニンの発現と核内移行について免疫蛍光染色法により定量的に評価した。

3) 定量的PCR

心臓SP細胞よりRNAを抽出後、LightCycler TaqMan Master Kit (Roche Applied Science社)を用いて行なった。解析はLightCycler Software ver. 3.5 (Roche社)を用いてSecond Derivative Maximum法にて定量分析した。

C. 研究結果

1) 心臓SP細胞はsham~0.4%、心筋梗塞1日~0.2%、3日後~1.6%、7日後~1.0%であり、梗塞3日後はshamに比較して有意に増加した。

2) 免疫染色法による β -カテニンの発現解析を

shamおよび心筋梗塞3日目の心臓SP細胞について検討した結果、 β -カテニン陽性細胞はsham 45%、梗塞マウス73%であった。また、shamおよび心筋梗塞3日目の心臓SP細胞の、それぞれ3%、6%に β -カテニンの核内移行が認められた。また、GSK-3 β 抑制薬BIOを心筋梗塞作成直後と3日目に腹腔内投与した場合、心臓SP細胞の72%に β -カテニンの発現が、また、25%に β -カテニンの核内移行が認められた。

3)定量的PCR法による遺伝子発現解析の結果、sham心臓SP細胞ではCyclinD1、Axin2、c-Mycの遺伝子発現は認められなかったが、梗塞3日目の心臓SP細胞では発現が認められた。また、BIOを投与した梗塞マウスの心臓SP細胞では、CyclinD1、c-Mycの発現が非投与梗塞マウスに比較して~1.6倍増加した。

以上の結果から、心筋梗塞時に心臓SP細胞にはcanonical Wnt signalを介した細胞増殖シグナルが作用し、GSK-3 β を抑制してcanonical Wnt signalを促進することにより増殖活性を亢進させることが示唆された。

D. 考察

一般に、臓器幹細胞は静止期にあり、増殖活性は制御されている。我々の検討でも心臓SP細胞は骨髄SP細胞と同様にG0期の細胞が高率に存在した。また、内在性の心臓幹細胞の病態時におけるin vivoでの増殖・分化の挙動に関しては明らかにされていない。本研究において、心筋梗塞時にはcanonical Wnt signalを介して心臓SP細胞は細胞周期に入り、増殖することが示唆された。今後、梗塞急性期において、内在性の心臓SP細胞、および、心臓SP細胞にWnt signalを供与する細胞の局在と動態を解析することが重要である。

E. 結論

内在性の心臓SP細胞の傷害心筋での動態を解析し、心筋梗塞時に心臓SP細胞はcanonical Wnt signalを介して細胞周期に入り増殖する

ことが示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

心筋分化誘導因子の単離同定に関する研究

分担研究者 南野 徹 千葉大学医学部附属病院循環器内科 助教

研究要旨 細胞移植を基盤とした心筋再生療法を確立するためには、分化多能性をもつ細胞を心筋細胞へ効率よく分化誘導させる技術の開発が必須である。昨年度までに分担研究者らはOP9細胞の培養上精中に存在する心筋分化誘導因子(X因子)を単離同定し、この因子がP19CL6細胞において心筋分化に必須の蛋白であることを示した。本年度はX因子がES細胞においても心筋分化に必須の蛋白であることを明らかにした。また、X因子の受容体を同定し、心筋分化誘導の分子機構の一端を明らかにした。

A. 研究目的

近年、心筋細胞へ分化しうる幹細胞を用いた心筋再生治療が注目されているが、臨床的に十分な数の心筋細胞を分化誘導する方法は確立されていない。本研究における分担研究者の目的は、種々の幹細胞を心筋細胞に分化誘導する因子の単離同定と、その心筋分化誘導の分子機構の解明である。本研究は細胞移植を基盤とした心筋再生療法の開発につながり、国民の福利厚生に寄与するものと考えられる。

B. 研究方法

昨年度までの研究で、分担研究者らはOP9細胞の培養上精中に存在する心筋分化誘導因子(X因子)を単離同定し、この因子がP19CL6細胞において心筋分化に必須の蛋白であることを明らかにした。今年度はES細胞においてX因子をノックダウンし、その役割を検討した。また、候補遺伝子アプローチによりX因子の受容体候補分子を選定し、実際にX因子がこの受容体に結合するかについて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は培養細胞を用いたものであり、特に倫理面での問題はないと考える。

C. 研究結果

ES細胞においてX因子をノックダウンしたところ、野生型ES細胞ではhanging drop法によって心筋細胞への分化が認められたが、X因子をノックダウンしたES細胞では心筋細胞への分化が著明に抑制された。また、候補遺伝子アプローチによりX因子の受容体を想定し、ヨードラベルしたX因子との結合を検討したところ、X因子との特異的結合が観察され、こ

の蛋白がX因子の受容体である可能性が示唆された。

D. 考察

今年度の研究により、X因子がES細胞において心筋分化に必須の蛋白であることが明らかになった。また、X因子の細胞表面受容体と思われる蛋白の同定にも成功した。今後は、これらの結果をもとにして、X因子が心筋分化誘導をおこす分子機構についての解析をさらに進めていくことを予定している。また、X因子、およびX因子と他の増殖因子の組み合わせによる高効率の心筋分化誘導法の確立を目的とした研究も進めていく予定である。

E. 結論

OP9細胞から分泌される心筋分化誘導因子(X因子)はES細胞の心筋分化に必須の蛋白であることが明らかになった。また、X因子の受容体の同定にも成功し、X因子が心筋分化誘導をおこす分子機構についてその一端を明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表 該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

厚生労働科学研究費補助金（再生医療等研究事業）
分担研究報告書

間葉系細胞の心筋分化誘導と不全心への移植
分担研究者 梅澤明弘 国立成育医療センター研究所・部長

研究要旨

生体内のさまざまな臓器由来の間葉系幹細胞株を確立し、マイクロアレイ法を用いて心筋分化が可能な細胞株群特異的に発現している遺伝子である Gremlin (Greml、骨形成因子 BMP アンタゴニスト) を同定した。Greml の心筋分化能は、DMSO を添加することで心筋分化を誘導できる P19CL6 細胞を用いて評価した。この結果、Greml が誘導開始直後の BMPs を阻害することで心筋分化を促進することを明らかにした。これらの一連の相互作用の解明は、初期の心筋発生と大きく関与している可能性を示しており、今後の臨床応用に向けた心筋再生医療に役立つと考えられる。

A. 研究目的

間葉系幹細胞は心筋分化が可能なことが知られているが、その分化誘導因子は、未だ同定されていない。そこで、マイクロアレイ法を用いて心筋分化が可能な細胞株群特異的に発現している遺伝子を特定し、その心筋分可能の評価、並びに作用機序について解明した。

B. 研究方法

心筋分化誘導因子の同定

GeneSpringソフトウェアを用いて、当研究室で樹立した細胞とNCBIのGeneChipデータベースであるGEO datasets

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gds&cmd=search&term=>) から取得した69種類のヒトGeneChipの結果を解析した。さらに発現の近い細胞同士をグループ化し、統計解析ソフトNIA array解析

(<http://lgsun.grc.nia.nih.gov/ANOVA/>) で処理することで、心筋分化が可能な細胞群特異的な遺伝子を選出した。

心筋分化誘導因子Gremlの誘導能の評価

Gremlの心筋分化能の評価には、P19CL6細胞を用いた。この細胞は、マウスC3H胚性ガン細胞であり、培養培地（10%ウシ血清入MEM-alpha）にDMSOを添加することで心筋細胞に分化誘導できる。この細胞にGremlを添加したときの動画撮影による拍動面積の測定、RT-PCR法による遺伝子発現の有無、免疫組織化学染色法によるタンパク質発現を、それぞれ評価した。またGremlの添

加期間を振って、最も高い心筋誘導能を示す時期を免疫組織化学染色法で評価した。

BMP2タンパク質による心筋分化阻害

分化誘導初期にリコンビナントヒトBMP2タンパク質をP19CL6細胞に添加し、RT-PCR法による遺伝子発現、免疫組織化学染色法による心筋特異的なタンパク質の有無を、それぞれ評価した。

BMP2タンパク質によるBmp2/4遺伝子発現抑制とBMP活性の経時的な変化

リアルタイムRT-PCR法を用いて、各条件で分化誘導したP19CL6細胞のBmp2/4遺伝子発現量の変化を経時的に測定した。同様にBMP活性値を測定できる *Id1* promoter-Lux プラスミドを用いたリポーターアッセイ法で、同活性値の変化を経時的に測定した。

BMP2タンパク質によるWnt3a遺伝子発現抑制とWnt活性の経時的な変化

リアルタイム RT-PCR 法を用いて、各条件で分化誘導した P19CL6 細胞の Wnt3a 遺伝子発現量の変化を経時的に測定した。同様に Wnt 活性値を測定できる TOPflash プラスミドを用いたリポーターアッセイ法で、同活性値の変化を経時的に測定した。

C. 研究結果

心筋分化誘導因子の同定

GeneSpringソフトウェアを用いて、69種類のヒトGeneChipを解析し、遺伝子発現の似た細胞をグループ化していったところ、30グループに

分けることができた。この30グループのうち、21グループは、心筋分化が可能な細胞群であり、このグループに特異的な遺伝子を統計解析ソフトであるNIA array解析

(<http://lgsun.grc.nia.nih.gov/ANOVA/>) で2つの遺伝子を選択できた。このうちの一つが今回選択したGremlin (Grem1) 遺伝子だった。

心筋分化誘導因子Grem1の誘導能の評価

CL6細胞にGrem1 (125 ng/ml) をDMSOとともに培地中に添加したところ、DMSOのみ添加した場合に比べて誘導開始14日目の拍動面積の顕著に増加できることを明らかにした。またRT-PCR法による遺伝子発現を調べたところ、先程同様にDMSOにGrem1を添加することで心筋細胞特異的な転写因子、構造タンパク質、ホルモンの発現が上昇することを明らかにした。さらに免疫組織化学染色法でも心筋特異的なタンパク質であるトロポニンTタンパク質やミオシン重鎖の発現がGrem1の添加によって発現量が上昇することを明らかにした。その一方で、Grem1単独では、P19CL6細胞に心筋特異的な遺伝子やタンパク質が一切発現しなかった。

次に、Grem1が最もCL6細胞の心筋分化に寄与する期間を調べたところ、誘導開始1日目から3日目の添加が一番高い誘導能を示した。

BMP2タンパク質による心筋分化阻害

BMP2タンパク質は、心筋分化を誘導するサイトカインとして知られており、心筋分化誘導実験でよく用いられている。今回、GeneChipの解析結果より選出したGrem1は、BMP2/4/7のアンタゴニストであり、BMPシグナルを阻害する。しかし、誘導開始1日目から3日目に添加することで心筋分化誘導率を上昇させる能力を持つことから、この誘導開始1日目から3日目のBMPシグナルは心筋分化を抑制している可能性がある。そこで、P19CL6細胞にBMP2タンパク質を誘導開始1日目から3日目に添加したところ、心筋特異的な転写因子やタンパク質の発現が極端に減少しており、心筋分化を阻害することが明らかとなった。また同細胞にBMP2タンパク質を誘導開始4日目から14日目に添加したところ、心筋特異的なタンパク質を発現した。

BMP2タンパク質によるBmp2/4遺伝子発現抑制とBMP活性の経時的な変化

誘導開始1日目から3日目にBMP2タンパク質を添加したP19CL6細胞は、Bmp2/4遺伝子の発現が抑制されていた。またBMPシグナルも検出できなかった(ただしBMP2タンパク質を添加した3日目だけはBMPシグナルを検出できた)。一方で、同時期にBMP2タンパク質を添加しなかったP19CL6細胞は、Bmp2/4遺伝子は誘導開始3日目から14日目まで発現しており、同期間のBMPシグナルも検出できた。

BMP2タンパク質によるWnt3a遺伝子発現抑制とWnt活性の経時的な変化

胚性細胞の心筋分化には、誘導開始直後にWntシグナルが必要となる。誘導開始1日目から3日目にBMP2タンパク質を添加したP19CL6細胞は、Wnt3a遺伝子の発現が抑制されていた。またWntシグナルも検出できなかった。一方で、同時期にBMP2タンパク質を添加しなかったP19CL6細胞は、Wnt3a遺伝子を1日目から3日目まで発現しており、Wntシグナルも3日目から5日目まで検出できた。

D. 考察

今回のバイオインフォマティクスを応用した心筋分化可能な細胞群特異的な遺伝子の選択方法は、有用であることが明らかとなった。この方法は様々な応用が利くために、心筋分化因子以外の因子の選択も可能である。また誘導開始初期のBMPタンパク質はWntシグナルを阻害することも明らかになったことからこの両者には何らかの相互作用があることも予測される。

E. 結論

Grem1は、P19CL6細胞に誘導開始初期に添加すると心筋分化を促進できた。また、心筋分化因子として知られているBMP2タンパク質は誘導開始初期には心筋分化を抑制した。これらのことは、再生医療としての心筋分化細胞の臨床応用化にも役立つ。心筋分化を行なう際、分化させたい細胞の分化ステージを確認し、そのステージに適した分化誘導を行なうことで誘導率の上昇が見込めるからである。例えば、ヒトES細胞やヒトiPS細胞といった胚性細胞の場合は、誘導開始直後にBMPタンパク質を添加すると心筋分化を抑制する可能性がある。その一方で、間葉系幹細胞といった細胞の場合、Grem1を添加して

も心筋分化抑制作用しか示さないことも予想される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyagawa Y, Okita H, Nakajima H, Horiuchi Y, Sato B, Taguchi T, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata JI, Umezawa A, Kiyokawa N. Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells. *Mol Cell Biol.* in press
2. Yazawa T, Uesaka M, Inaoka Y, Mizutani T, Sekiguchi T, Kajitani T, Kitano T, Umezawa A, Miyamoto K. Cyp11b1 is induced in the murine gonad by luteinizing hormone/ human chorionic gonadotropin and involved in the production of 11-ketotestosterone, a major fish androgen; conservation and evolution of androgen metabolic pathway. *Endocrinology.* in press
3. Takeuchi M, Takeuchi K, Kohara A, Satoh M, Shioda S, Ozawa Y, Ohtani A, Morita K, Hirano T, Terai M, Umezawa A, Mizusawa H. Chromosomal instability in human mesenchymal stem cells immortalized with human papilloma virus E6, E7, and hTERT genes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 43(3-4):129-38. 2007
4. Yoshida Y, Shimomura T, Sakabe T, Ishii K, Gonda K, Matsuoka S, Watanabe Y, Takubo K, Tsuchiya H, Hoshikawa Y, Kurimasa A, Hisatome I, Uyama T, Terai M, Umezawa A, Shiota G. A role of Wnt/beta-catenin signals in hepatic fate specification of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 293(5):G1089-98. 2007
5. Sato B, Katagiri Y, Miyado K, Akutsu H, Miyashita Y, Horiuchi Y, Nakajima H, Okita H, Umezawa A, Hata J, Fujimoto J, Toshimori K,

Kiyokawa N. Preferential localization of SSEA-4 in interfaces between blastomeres of mouse preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun.* 364:838-43. 2007

6. Kato S, Mohri Y, Matsuo T, Ogawa E, Umezawa A, Okuyama R, Nishimori K. Eye-open at birth phenotype with reduced keratinocyte motility in LGR4 null mice. *FEBS Lett.* 581(24):4685-90. 2007
7. Hashii N, Kawasaki N, Nakajima Y, Toyoda M, Katagiri Y, Itoh S, Harazono A, Umezawa A, Yamaguchi T. Study on the quality control of cell therapy products. Determination of N-glycolylneuraminic acid incorporated into human cells by nano-flow liquid chromatography/Fourier transformation ion cyclotron mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1160(1-2):263-9. 2007
8. Toyoda M, Takahashi H, Umezawa A. Ways for a mesenchymal stem cell to live on its own: maintaining an undifferentiated state ex vivo. *Int J Hematol.* 86(1):1-4. 2007
9. Shimomura T, Yoshida Y, Sakabe T, Ishii K, Gonda K, Murai R, Takubo K, Tsuchiya H, Hoshikawa Y, Kurimasa A, Hisatome I, Uyama T, Umezawa A, Shiota G. Hepatic differentiation of human bone marrow-derived UE7T-13 cells: Effects of cytokines and CCN family gene expression. *Hepatol Res.* 37(12):1068-79. 2007
10. Okamoto K, Miyoshi S, Toyoda M, Hida N, Ikegami Y, Makino H, Nishiyama N, Tsuji H, Cui CH, Segawa K, Uyama T, Kami D, Miyado K, Asada H, Matsumoto K, Saito H, Yoshimura Y, Ogawa S, Aeba R, Yozu R, Umezawa A. Working" cardiomyocytes exhibiting plateau action potentials from human placenta-derived extraembryonic mesodermal cells. *Exp Cell Res.* 313(12): 2550-62. 2007
11. Nishiyama N, Miyoshi S, Hida N Miss,

Uyama T, Okamoto K, Ikegami Y, Miyado K, Segawa K, Terai M, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. The Significant Cardiomyogenic Potential of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells in Vitro. *Stem cells*. 25(8):2017-24. 2007

12. Cui CH, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, and Umezawa A. Human dystrophin expression in the mdx mouse, a model of Duchenne muscular dystrophy, can be conferred predominantly by "cell fusion" with human menstrual blood-derived cells. *Mol Biol Cell*. 18(5):1586-94. 2007

13. Umezawa A, Toyoda M. Two MSCs : Marrow stromal cells and mesenchymal stem cells. *Inflammation and Regeneration*. 27(1):28-36. 2007

14. Yamada Y, Sakurada K, Takeda Y, Gojo S, Umezawa A. Single-cell-derived mesenchymal stem cells overexpressing Csx/Nkx2.5 and GATA4 undergo the stochastic cardiomyogenic fate and behave like transient amplifying cells. *Exp Cell Res*. 313 :698-706. 2007

15. Sugiki T, Uyama T, Toyoda M, Morioka H, Kume S, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Tsumaki N, Takahashi Y, Toyama Y, Umezawa A. Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts. *J Cell Biochem*. 100(5):1240-54. 2007

2. 学会発表

1. 上大介、渡邊昌俊、梅澤明弘 : 心筋形成因子としてのグレムリン-胎児性癌細胞を拍動心筋に-、第96回日本病理学会総会、大阪、2007年3月

2. 岡本一真、三好俊一郎、西山伸弘、池上憲幸、上大介、宇山太郎、宮戸健二、梅澤明弘 : Human Mesenchymal Stem Cell from Human Chorionic Villi is a New Cell Source for Autologous Cardiac Stem Cell Therapy、第

71回日本循環器学会学術集会、神戸、2007年3月

3. 上大介、渡邊昌俊、梅澤明弘 : GeneChipとNIA array analysisを用いた心筋形成因子の探索-胎児性癌細胞を拍動心筋に-、第28回日本炎症・再生医学会、東京、2007年8月

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

1. 「心筋細胞分化誘導促進剤及びその使用方法—テルミサルタン、バルサルタンを用いる」

発明者：梅澤明弘、三好俊一郎、小川聡

出願日：特願2007-315920、平成19年12月6日

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

2. 「心筋細胞分化誘導促進剤及びその使用方法—ピオグリタゾンを用いる」

発明者：梅澤明弘、三好俊一郎、小川聡

出願日：特願2007-315921 平成19年12月6日

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

1. 実用新案登録
なし

2. その他
なし

移植組織の血管新生についての研究

分担研究者 国立循環器病センター研究所循環器形態部 部長 望月直樹

研究要旨 心臓再生には心筋細胞の再生とともに血管新生の誘導が不可欠である。心筋細胞と毛細血管の内皮細胞間の相互調節 (内皮細胞からのNeuregulin心臓へ、心筋細胞からangiopoietinが内皮細胞へ作用) が心臓の機能調節に重要であることを突き止めた。

A. 研究目的

心臓の再生には心筋細胞への酸素、グルコース、脂肪酸などのエネルギーの供給のために血管が不可欠である。このため、毛細血管の発達が心筋細胞の発生・再生には不可欠である。虚血性心疾患による心不全を治療するには細胞治療の確立が急務である。組織幹細胞を念頭においた心臓の再生、体外からの細胞移植による治療が考えられている。このためには、心筋細胞と血管構築細胞の再生が重要であり、この相互作用を理解することが再生医療を考えることが不可欠となる。効率適な心臓の再生のために、両者の共調性をまず理解することが将来の有益な心臓再生治療を結実させる早道であると考えて本研究を行った。

B. 研究方法

1) 心筋の発生に重要なErbB受容体の下流で機能する分子Gabファミリー分子のノックアウトマウスの作製による心筋-内皮細胞間シグナルの理解

心筋細胞の機能維持にはErbBファミリーチロシンキナーゼ受容体のシグナルが重要であることが示されている。心筋再生にもErbBファミリー受容体のシグナルは不可欠であると予想した。これまでに心臓の保護作用に必須であるErbBと、gp130の両者の下流で機能するアダプター分子Gabファミリー分子を心臓で特異的に欠損させたマウスを作製した。

- (1) alpha-Myosin Heavy Chain Promoter-Cre (aMHC-Cre) マウスの入手
- (2) conventional Gab2 KOマウス
- (3) conditional Gab1 KO マウスの作製 (floxed Gab1)

のマウスをCre/loxPシステムを用いて心臓でGab1を欠損させるように計画し、さらにGab2 KOマウスとの交配をおこなった。以上により、4群のマウスを作製した。

- ① control マウス-control
- ② 心臓特異的Gab1 KOマウス-Gab1CKO
- ③ 全身Gab2欠損マウス-Gab2KO
- ④ 心臓でGab1 Gab2欠損マウス-DoubleKO (②と③の交配による。)

2) 骨髄間葉系細胞に発現する機能未知分子PTK

の心臓分化における機能の解析

これまでにPTK7が骨髄間葉系細胞に発現することをsignal sequence trapでとらえていた。心臓に分化することがよく知られているP19細胞でのPTK7の発現を検討した。

C. 研究結果

Gabファミリー分子の欠損により心筋症様の病態を呈する

- (1) 計画にそって作成した4群のマウスがメンデルの法則に従って誕生することから胎生致死ではないことがまず確認された。
- (2) 心臓のGab1ファミリー分子のリン酸化を誘導するのが、EGFファミリー分子のなかでもこれまで重要と考えられてきたHB-EGFではなく、Neuregulin-ErbB2/4系であることをマウス、培養心筋細胞で明らかにした。

このNeuregulin刺激で心臓のERKならびにAKTの活性化を検討したとこと、DKOマウスでのみERK, AKTの活性化が抑制されていた。DKOマウスのみ、生後から著明な心拡大と心臓内膜の線維化をしめた。これに矛盾しない結果として心臓の超音波検査と心臓のカテーテル検査で心機能低下を確認した。心内膜の線維化はエラスチンとコラーゲンの顕著な蓄積の結果であった。心臓内の血管数を定量化したところ、最小血管数の現象を認め、異常に拡張した内皮細胞だけで血管平滑筋層を伴わない異常な血管も多数認めた。

以上の結果から心筋内のシグナルだけでなく心臓からの内皮細胞のなんらかの栄養因子の欠落により内皮細胞系の異常をきたしていると予想し、microarrayを行った。その結果DKOではangiopoietinの遺伝子発現が著明に低下していることがわかった。

PTK7は心臓への分化刺激で発現が増加する

- (1) まずanti-PTK抗体を作製した。この抗体の特異性を確認した。
- (2) P19CL9細胞をDMSOで分化誘導後数日でのPTKの発現を調べたところ、誘導2-3日目为数倍の発現を認めた。

D. 考察

心臓の収縮機能、生存機能維持にはErbBファミ

リー分子が重要でありその下流のアダプター分子Gabがの心機能維持における重要性をまず示した。血管内皮細胞から分泌されるNeuregulinがErbBの活性化因子として特に心筋では重要であることも突き止めた。また、Gab欠損により心筋細胞からのangiopoietinの発現が著明に低下しているためにangiopoietinの受容体を発現する心内膜内皮細胞、血管内皮細胞の変化をきたしている可能性が予想された。その予想に一致して内膜の線維化ならびに、血管数の現象・異常血管の出現を認めた。以上の結果から心筋細胞と毛細血管の内皮細胞間の相互調節（内皮細胞からのNeuregulinが心臓へ、心筋細胞からangiopoietinが内皮細胞へ作用）が、心臓の機能調節に重要であることを突き止めた。

昨年までに心筋細胞への分化が示されている骨髄間葉系細胞に発現するPTK7分子を同定していたが、機能未知であった。このため、まず心臓への分化にしたがって発現が変化するか否かを検討したところ、心臓の分化前、誘導とともに発現が明かに増加することから、心臓への分化に重要な分子である可能性が考えられた。

E. 結論

内皮細胞からのNeuregulinが心臓へ、心筋細胞からangiopoietinが内皮細胞へ作用が心臓の再生のためのシグナルとして重要であることがわかった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

(研究業績「英文」)

【原著】

- (1) Nakaoka Y, Nishida K, Narimatsu K, Kamiya A, Minami T, Sawa H, Okawa K, Fujio Y, Koyama T,¹ Maeda M, Sone M, Yamasaki S, Arai Y, Koh GY, Kodama T, Hirota H, Otsu K, Hirano T, Mochizuki N. Gab family proteins are essential for postnatal maintenance of cardiac function through transmitting neuregulin-1 /ErbB signaling. *J Clin. Invest* 117:1771-1181, 2007
- (2) Seguchi O, Takashima S, Yamazaki S, Asakura M, Asano Y, Shintani Y, Wakeno M, Minamino T, Kondo H, Furukawa H, Nakamaru K, Naito A, Takahashi T, Ohtsuka T, Kawakami K, Isomura T, Kitamura S, Tomoike H, Mochizuki N, Kitakaze M. A cardiac myosin light chain kinase regulates sarcomere assembly in the vertebrate heart. *J Clin. Invest* 117; 2812-2824, 2007
- (3) Myoishi M, Hao H, Minamino T, Watanabe K, Nishihira K, Hatakeyama K, Asada Y, Okada K, Ishibashi-Ueda H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML, Mochizuki N, Kitakaze M. Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation* 116, 1226-1233, 2007
- (4) Min JK, Cho YL, Choi JH, Kim Y, Kim JH, Yu YS, Rho J, Mochizuki N, Kim YM, Oh GT, Kwon YG. Receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B ligand (RANKL) increases vascular permeability; Impaired permeability and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Blood* 109: 1495-1502, 2007
- (5) Takaya A, Kamio T, Masuda M, Mochizuki N, Sawa H, Sato M, Nagashima K, Mizutani A, Matsuno A, Kiyokawa E, Matsuda M. R-Ras regulates exocytosis by Rgl2/Rlf-mediated activation of RalA on endosomes. *Mol Biol Cell*. 18:1850-60,2007

2. 学会発表
特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sano M, Minamino T, Komuro I, et al.	p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload	Nature	446	444-448	2007
Van den Boom, Komuro I, et al.	UTF1 is a chromatin-associated protein involved in ES cell differentiation	J Cell Biol	178	913-924	2007

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Miyagawa Y, Okita H, Nakajima H, Horiuchi Y, Sato B, Taguchi T, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata JI, Umezawa A, Kiyokawa N.	Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells.	Mol Cell Biol.			in press
Yazawa T, Uesaka M, Inaoka Y, Mizutani T, Sekiguchi T, Kajitani T, Kitano T, Umezawa A, Miyamoto K.	Cyp11b1 is induced in the murine gonad by luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin and involved in the production of 11-ketotestosterone, a major fish androgen; conservation and evolution of androgen metabolic pathway.	Endocrinology			in press
Takeuchi M, Takeuchi K, Kohara A, Satoh M, Shioda S, Ozawa Y, Ohtani A, Morita K, Hirano T, Terai M, Umezawa A, Mizusawa H.	Chromosomal instability in human mesenchymal stem cells immortalized with human papilloma virus E6, E7, and hTERT genes.	In Vitro Cell Dev Biol Anim.	43(3-4)	129-38	2007

Yoshida Y, Shimomura T, Sakabe T, Ishii K, Gonda K, Matsuoka S, Watanabe Y, Takubo K, Tsuchiya H, Hoshikawa Y, Kurimasa A, Hisatome I, Uyama T, Terai M, Umezawa A, Shiota G.	A role of Wnt/beta-catenin signals in hepatic fate specification of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells.	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.	293(5)	1089-98	2007
Sato B, Katagiri Y, Miyado K, Akutsu H, Miyashita Y, Horiuchi Y, Nakajima H, Okita H, Umezawa A, Hata J, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N.	Preferential localization of SSEA-4 in interfaces between blastomeres of mouse preimplantation embryos.	Biochem Biophys Res Commun.	364	838-43	2007
Kato S, Mohri Y, Matsuo T, Ogawa E, Umezawa A, Okuyama R, Nishimori K.	Eye-open at birth phenotype with reduced keratinocyte motility in LGR4 null mice.	FEBS Lett.	581(24)	4685-90	2007
Hashii N, Kawasaki N, Nakajima Y, Toyoda M, Katagiri Y, Itoh S, Harazono A, Umezawa A, Yamaguchi T.	Study on the quality control of cell therapy products. Determination of N-glycolylneuraminic acid incorporated into human cells by nano-flow liquid chromatography/Fourier transformation ion cyclotron mass spectrometry.	J Chromatogr A.	1160(1-2)	263-9	2007
Toyoda M, Takahashi H, Umezawa A.	Ways for a mesenchymal stem cell to live on its own: maintaining an undifferentiated state ex vivo.	Int J Hematol.	86(1)	1-4	2007
Shimomura T, Yoshida Y, Sakabe T, Ishii K, Gonda K, Murai R, Takubo K, Tsuchiya H, Hoshikawa Y, Kurimasa A, Hisatome I, Uyama T, Umezawa A, Shiota G.	Hepatic differentiation of human bone marrow-derived UE7T-13 cells: Effects of cytokines and CCN family gene expression.	Hepatol Res.	37(12)	1068-79	2007
Okamoto K, Miyoshi S, Toyoda M, Hida N, Ikegami Y, Makino H, Nishiyama N, Tsuji H, Cui CH, Segawa K, Uyama T, Kami D, Miyado K, Asada H, Matsumoto K, Saito H, Yoshimura Y, Ogawa S, Aeba R, Yozu R,	Working" cardiomyocytes exhibiting plateau action potentials from human placenta-derived extraembryonic mesodermal cells.	Exp Cell Res.	313(12)	2550-62	2007