

2008/11006A

別添1

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

ヒトES細胞由来心筋細胞の表面マーカー探索および
大量培養・純化システムの構築

平成20年度 総括研究報告書

主任研究者 日高 京子

平成21 (2009) 年 3月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

ヒトES細胞由来心筋細胞の表面マーカー探索および
大量培養・純化システムの構築

平成20年度 総括研究報告書

主任研究者 日高 京子

平成21 (2009) 年 3月

目 次

I. 総括研究報告

ヒトES細胞由来心筋細胞の表面マーカー探索および大量培養・
純化システムの構築

日高京子-----1

II. 分担研究報告

ヒトES細胞における心筋分化誘導法の検討

森崎隆幸-----6

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

-----10

IV. 研究成果の刊行物・別刷

-----11

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総括研究報告書

ヒト ES 細胞由来心筋細胞の表面マーカー探索および
大量培養・純化システムの構築

主任研究者 日高京子 国立循環器病センター研究所 室長

研究要旨

ES 細胞（および iPS 細胞、人工多能性幹細胞）はともに高い増殖能と多能性を持ち、分化メカニズムの解明といった基礎研究の細胞ソース、薬効・毒性試験の細胞ソース、究極的には細胞移植のソースとしての役割が期待されている。心臓は再生能力の低い臓器であり、心筋細胞は生後まもなく増殖を停止することから、その入手は極めて困難であり、ヒト ES 細胞（あるいは iPS 細胞）から分化誘導させた心筋細胞が大いに期待されている。ES 細胞の分化誘導は胚様体と呼ばれる 3 次元構造形成を経て行われることが多いが、胚様体の中には多系譜の細胞が混在し、心筋細胞あるいはその前駆細胞を選別する必要がある。本研究は心筋細胞およびその前駆細胞の大量調製の実現に向けたプロジェクトであり、その一環として、効率的分化誘導法の確立、そのための分化メカニズムの解明、マーカーの探索、単離システムの確立をめざすものである。心筋細胞にはこれまで効率的単離を容易にする細胞表面マーカーがほとんど知られておらず、遺伝子操作によりマーカーを導入することによってのみ単離が可能であった。今年度においてはまず、(1) マウス ES 細胞を用いて心筋への効率的分化誘導法の開発を引き続き行い、懸濁培養によって高い心筋分化能を有した胚様体を得る系を確立した。つぎに、(2) 候補マーカーを用いた磁気ビーズによる簡便な単離法（MACS 法）を確立し、細胞の処理能力を現行の約 100 倍（理論値）上昇させることに成功した。これらの (1) (2) はともに大量化可能な系であり、細胞の大量調製という目的に一步近づいた。さらに、(3) ヒト ES 細胞を用いた培養にも着手し、(1) で得た条件と同様な条件で均一な胚様体を得ることに成功しており、心筋分化条件を検討するところである。最終年度ではヒト細胞を用いたマーカーの特異性の検討、分化誘導および単離方法のさらなる効率化に向けて研究を進めていきたい。

分担研究者

国立循環器病センター研究所
森崎隆幸

A. 研究目的

本研究は ES 細胞、および ES 細胞と同様

の性質を有する iPS 細胞より大量に効率よく心筋細胞を得るために、心筋および心筋前駆細胞で発現するマーカーを探索し、簡便かつスケールアップ可能な単離法を開発することを目的とする。ES 細胞はさまざまな細胞に分化するが、再生医療の細胞ソースとして利用するためにはここから目的の細胞を取り出す必要がある。これまでにヒト ES 細胞から大量に心筋分化誘導を行い、ラット心筋梗塞モデルに移植した実験が報告されているが、心筋細胞自体が心機能改善に貢献したというよりは、パラクリン効果によるものが大きいとされている。ES 由来心筋細胞の Efficacy を評価するには大量の細胞を得たうえで、移植片化することが望ましいと考えられる。また、これまでの報告ではほとんどの場合密度勾配を利用した標的細胞の濃縮が行われており、安全性という観点からも、特異的表面マーカーの同定は有用な材料になると考えられる。今年度においては、マウス ES 細胞を用いた (I) 大量化可能な分化誘導法の検討、(II) 大量化可能な単離法の検討、および (III) ヒト ES 細胞を用いた分化誘導の検討を行い、以下の実験を行った。

B. 研究方法

本年度における研究はマウスおよび ES 細胞を用いて行った。マウス ES 細胞は胚様体形成を経て分化誘導させた。胚様体形成は①血清存在下におけるハンギングドロップ法、②無血清 (サプリメント含有) 培地における懸濁培養法により行った。胚様体形成後は大量の培地 (10%血清) に胚様体を浮遊させ、さらに 4-5

日培養させることにより自動拍動する胚様体を得た。ヒト ES 細胞は①②の他に③マトリゲル上での無血清培養法 (分化因子添加) も試みた。分化の評価は①自動拍動する胚様体の割合、②収縮タンパク質抗体を用いた免疫染色、③Nkx2.5-GFP ノックイン細胞における GFP の発現の割合、④リアルタイム RT-PCR における心筋およびその他の細胞系譜マーカーの発現、などを用いて行った。

C. 研究成果

I. 大量化可能な分化誘導条件の検討。
ES 細胞は胚様体形成を経て心筋細胞を生じることが知られているが、従来のハンギングドロップ法では 5,000 個の EB を作るのに約 1 時間要しており、これから得られる細胞は d0 (input) Total 2.5×10^6 細胞に対し、d7 (output) 3.4×10^7 である。昨年度では EB チップと呼ばれる専用のデバイスを用いることにより 1,000 EB を 1 枚のチップ上に作成する方法を試みたが、コスト面とチップの供給面での問題を考えると大量化が難しいという考えにいたった。そこで今年度では懸濁培養による胚様体作成を試みた。この方法は古典的方法であるが、ハンギングドロップに比べると均一に胚様体ができないという問題があった。そこで培養時の培地の検討を行い、ある無血清培地で比較的均一な胚様体を得られることが分かった。得られた胚様体を解離させた細胞を FACS 解析すると、従来のハンギングドロップ法に匹敵する割合で Nkx2.5/GFP 陽性細胞が得られることがわかった。

II. 大量化可能な単離法の検討。これまで蛍光を利用したセルソーターにより陽性細胞を単離していたが、現在使用しているセルソーター (BD FACS Aria) では一時間あたり 10^7 のオーダーの細胞しか処理できない。大量化するには方向性のある分化誘導や、別の方法 (たとえば密度勾配) による前濃縮との組み合わせが必至である。そこで磁気ビーズを利用した MACS による単離法を検討した。MACS では陽性と陰性のシグナルが高くないと純度の高い細胞を得ることが難しいが、カラムを 2 本、2 回かけることにより、FACS と匹敵する純度 (95%) の細胞を得ることができた。現在使用している MACS の処理能力はカラムや機種に依存するが、現有機器 (AutoMACS) では 4×10^8 細胞 (すなわち現在の約 100 倍) 処理が可能である。以上のようにして得られた心筋細胞および心筋前駆細胞の性質を検討するために、ソート後の細胞の電気生理学的・免疫学的性質を調べたほか、ヌードマウスの腎臓被膜下に移植して、*in vivo* における生存を確認した。

III. ヒト ES 細胞からの心筋分化誘導の検討。京都大学で樹立された KhES1 および 3 について、胚様体法およびマトリゲルを用いた 2 次元培養法 (Activin および BMP 添加) を用いて分化誘導を試みた。胚様体はマウス ES 細胞で得られた条件 (無血清・懸濁培養) により比較的均一な胚様体を得ることができたが、その後の培養で心筋への効率的な分化は認められなかった。Activin、BMP を用いた 2 次元培

養法によっても効率的な分化は認められなかった。

(倫理面への配慮)

ヒト ES 細胞使用については研究機関内の倫理委員会の承認が得られ、文部科学省での確認の後、使用を開始した。遺伝子組換え実験は研究機関の委員会の承認を得て行われた。動物の取扱いについても研究機関の委員会の承認を得て行われ、また、動物愛護に配慮して実験を行った。

D. 考察

I. 大量化可能な分化誘導条件の検討～無血清培地を用いた懸濁培養による胚様体の形成。ヒト ES 細胞の分化誘導条件に用いられている培地 DMEM-F12, B27+N2 supplement を用いた場合、血清存在下で懸濁培養したときに比べて均一な胚様体を形成することがわかった。ハンギングドロップにくらべると個々の胚様体の大きさにはばらつきがあるものの、Nkx2.5/GFP 陽性の割合はハンギングドロップに匹敵する細胞が分化した。しかしながら胚様体形成後は大量の培地とともに大きな培養皿に移すことを必要とし、省スペースという観点ではさらなる検討が必要であると考えられた。

II. 大量化可能な単離法の検討～MACS による簡便な単離法の確立。本年度は処理能力のより高い MACS を用いて候補マーカー X による分離システムを確立することができた。MACS を用いた場合の収率は FACS よりも高く、これによりラボスケールの実験 (5,000 個の胚様体作成)

より 10^6 の心筋細胞・前駆細胞をルーチンに得ることが可能となった。来年度は得られた細胞についての分化能・増殖能についてさらに検討を進め、ヒト ES 細胞において応用可能であるかを検討したい。

III. ヒト ES 細胞からの心筋分化誘導の検討～効率よい誘導法の確立が必要。これまでに報告されている分化誘導法を試してみたが、解析に十分な心筋細胞を得るにいたっていない。さらなる条件の検討および複数の細胞株を用いた実験が必要になると考えられる。

E. 結論

本年度ではマウス ES 細胞を用いて、懸濁培養による大量分化誘導、MACS を用いた簡便な単離法の確立等、スケールアップ可能なシステムの確立を行うことに成功した。これらは ES 細胞由来心筋細胞の大量調製に向けての大きな前進となると考えられる。スケールアップは理論値では現時点での 100 倍は可能であるが培養スペースの問題や胚様体回収の手間を考えると理論どおりにはいかない点も多い。省スペース化、およびより心筋にコミットした分化誘導法を確立することによりこれらの問題を乗り越えたい。ヒト ES 細胞の分化誘導についてはまだまだ問題が多く、まず実験可能なレベルまで分化誘導させなければならない。複数種の株の検討を含め来年度の課題としたいと考えている。心筋細胞は胎仔や新生仔の初代培養でしか得られなかったソースであり、(したがってヒトの場合はほぼ入手困難)、分化直前・直後の心筋細胞の増殖能

や分化能についてはまだ解明されていない部分も多い。大量に得ることのできるようになった細胞を利用しさらなる分化誘導の効率化、さらに特異性の高いマーカーの探索を行う足がかりになると考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yano S, Miake J, Mizuta E, Manabe K, Bahrudin U, Morikawa K, Arakawa K, Sasaki N, Igawa O, Shigemasa C, Yamamoto Y, Morisaki T, Hidaka K, Kurata Y, Yoshida A, Shiota G, Higaki K, Ninomiya H, Lee JK, Shirayoshi Y, Hisatome I: Changes of HCN gene expression and I(f) currents in Nkx2.5-positive cardiomyocytes derived from murine embryonic stem cells during differentiation. *Biomed Res* 29: 195-203, 2008.
- 2) Kado M, Lee J-K, Hidaka K, Miwa K, Murohara T, Kasai K, Saga S, Morisaki T, Ueda Y, Kodama I: Paracrine factors of vascular endothelial cells facilitate cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 377: 413-418, 2008
- 3) 森崎隆幸・日高京子 「ES 細胞の現状と問題点：基礎と応用」 分子心血

管病 (in press)

2. 学会発表

- 1) Kyoko Hidaka, Ryo Sugawa, Manabu Shirai, Yousuke Takahama, Takayuki Morisaki, Pharyngeal endoderm development from embryonic stem cells, 6th International Society for Stem Cell Research Annual Meeting (Philadelphia, PA, USA) 平成 20 年 6 月
 - 2) 本多賢彦、日高京子、白井学、森崎隆幸 心臓形成期における Dishevelled 結合因子 Dact1 の発現解析、第 31 回日本分子生物学会 平成 20 年 12 月
 - 3) 白井学、日高京子、若山貴成、森崎隆幸 細胞表面マーカーの発現パターンによる、心臓予定領域形成の詳細な解析 第 31 回日本分子生物学会 平成 20 年 12 月
 - 4) 若山貴成、日高京子、白井学、森崎隆幸、ES 細胞由来心筋前駆細胞の表面マーカーによる単離と解析、第 31 回日本分子生物学会 平成 20 年 12 月
 - 5) 宮本章子、日高京子、白井学、金谷信彦、森崎隆幸 骨格筋分化における RNA 結合タンパク質遺伝子 Rbm24 および Rbm38 の機能解析 第 31 回日本分子生物学会 平成 20 年 12 月
 - 6) 日高京子、須川涼、新田剛、白井学、高浜洋介、雨貝孝、森崎隆幸 マウス ES 細胞からの咽頭内胚葉の分化 第 31 回日本分子生物学会 平成 20 年 12 月
 - 7) Kyoko Hidaka, Takayuki Morisaki Purification of ES cell-derived cardiomyocytes using cell surface markers 第 6 回心血管幹細胞研究会 平成 21 年 1 月
 - 8) 日高京子、若山貴成、白井学、李鍾國、児玉逸雄、森崎隆幸 表面マーカーを用いた ES 細胞由来心筋細胞単離法の確立 第 8 回日本再生医療学会 平成 21 年 3 月
 - 9) Kyoko Hidaka, Takanari Wakayama, Manabu Shirai, Takayuki Morisaki Isolation and characterization of ES-derived cardiac progenitor cells based on surface markers: Keystone Symposium: Cardiac Disease: Development, Regeneration, and Repair (Asheville, NC) 平成 21 年 3 月
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

ヒト ES 細胞における心筋分化誘導法の検討

分担研究者 森崎隆幸 国立循環器病センター研究所 部長

研究要旨

無限増殖能と多能性を有する ES 細胞は自動拍動する心筋細胞を生じ、ヒト ES 細胞は心筋に対する細胞移植のリソースとして注目される。しかし、心筋細胞への効率的な分化とその単離を行うための条件についての情報は不十分である。特に、ヒト ES 細胞はマウス ES 細胞に比して心筋細胞への分化は時として困難であることが知られる。今年度ではまず、文献情報およびこれまでにマウス ES 細胞で確立した分化誘導法（胚様体または 2 次元培養、血清または無血清・増殖因子添加）をもとに、ヒト ES 細胞での分化誘導をおこなった。また、これとは逆に、ヒト ES 細胞で報告された分化誘導方がマウス ES 細胞に適応できるかどうかを調べることにより、マウス⇄ヒトの分化誘導法の互換性を検討した。この結果、ヒトとマウスの分化誘導法には種を超えて相互に応用可能な過程があることが示唆されたが、細胞株ごとの分化しやすさ、しにくさといった別の問題もあることが明らかとなった。このことと一致して、近年、ヒト ES 細胞・iPS 細胞は細胞株の違いによる性質の違い、とくに分化方向性の違いが存在することが指摘されはじめている。分化能力を効率よく検討するために、さらなる情報収集と効率の良い分化の評価方法が今後必要になると考えられた。

A. 研究目的

本研究は ES 細胞からの心筋細胞の効率的な分化・分離法を開発し、ヒト ES 細胞の心筋細胞への分化を誘導する再現性および効率性の高い分化誘導条件の確立を目指して実施した。我々はこれまでにマウス ES 細胞の分化過程で発現する

遺伝子を網羅的に探索し、分化分離法開発に資する候補の選別を行ってきた。すでに昨年度報告しているようにマウス ES 細胞胚様体分化過程において一時的に血清を除去すると心筋への分化が促進される。同様な報告がヒト ES 細胞についても報告されており、ヒト ES 細胞とマウ

ス ES 細胞には共通する分化誘導過程があり、誘導法も一部応用可能であることが期待された。本年度は、ヒト ES 細胞を用いた培養と分化誘導実験に着手し、マウス ES 細胞で得られた知見が応用可能であるのか、ヒト ES 細胞で新たな視点での検討が必要であるのかについて、情報収集・文献考察を併用して実施した。

B. 研究方法

本年度はヒト ES 細胞の適切な心筋分化条件確立を行うための基礎事項の把握を次の方法で進めた。使用した細胞株は国内樹立株 KhES1, KhES3 およびその亜株である。まず、国内外のヒト ES 細胞の分化条件についての情報集積を進め、心筋分化が観察・報告された条件について比較検討を行った。今回使用した分化誘導条件は、主として(1)血清存在下における胚様体形成による方法、(2)血清非存在下における胚様体形成による方法、(3)マトリゲル上での 2 次元培養にアクチビン、BMP を添加する誘導法、およびこれらを改変した方法である。また、ヒト ES 細胞において成功している誘導方法が逆にマウスで応用できるのかどうかも検討し、両者の分化誘導過程・誘導方法の互換性を検討した。分化過程・分化後での評価としては自動拍動能観察のほか、形態的観察、RT-PCR や免疫染色による遺伝子発現・タンパク質発現解析を検討したほか、マウス ES 細胞の場合は Nkx2.5-EGFP ノックイン ES 細胞における GFP の発現を指標とした。

C. 研究成果

マウス ES 細胞とヒト ES 細胞は細胞解離に対する耐性が異なり、マウス ES 細胞での従来の胚様体形成法 (Hanging drop) では胚様体がうまく形成できなかった。しかしながら、無血清培地での懸濁培養および専用の胚様体形成デバイス (EB チップ、昨年度報告) では比較的均一な胚様体を得ることができた。胚様体形成後については血清存在下での浮遊培養 (のちに血清除去) または無血清での浮遊培養をおこなったが、効率よく心筋に分化した胚様体を得ることはできなかった。また、マトリゲル上での 2 次元培養 (アクチビンと BMP 添加) による方法においても、十分に分化誘導させることはできなかった。一方、マウス ES 細胞においてはヒト ES 細胞ですでに報告されている方法 (2 次元培養でのアクチビン、BMP 添加) により、効率よく心筋に分化することが確認できた。

D. 考察

マウス ES 細胞の心筋分化誘導法には、(1)胚様体浮遊培養 (血清を途中で除去、昨年度報告済み)、(2)胚様体浮遊培養 (無血清・アクチビンと BMP の添加)、(3)OP9 ストロマ細胞との共培養による方法などの報告がある。今回、ヒト ES 細胞で成功している 2 次元培養法 (アクチビン、BMP 添加) もマウス ES 細胞でうまくいくことがわかったが、今年度使用したヒト ES 細胞については、上記のどの方法によっても効率的分化誘導が困難であることがわかった。近年、ヒト ES 細胞株 (もしくは iPS 細胞) は株ごとの分化能におけるばらつきがあると指摘さ

れており、今回の結果が株の違いを反映しているのか、我々の分化誘導方法や培養方法に問題があったのかは不明であるが、このことを明らかにさせるためにも別の細胞株での分化誘導検討が必要であると思われる。分化誘導法としては、今回試した方法のほかには内胚葉系細胞 (END-2) との共培養も報告されており、この方法を含めて他の方法についても積極的に情報収集を行い、試してみる必要があるだろうと思われる。また、多種多様な分化条件や株の検討を行うためにも、効率の良い分化評価法が必須であると考えられた。次年度はこのことも踏まえて検討課題としたい。

E. 結論

本研究ではこれまでマウス ES 細胞で明らかになった血清除去による心筋への効率的分化誘導に加え、ヒト ES 細胞の心筋分化を検討したが、効率の良い分化誘導にはさらなる検討が重要であり、また、心筋分化が容易なヒト ES 細胞を用いて、その特徴の解析が今後必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yano S, Miake J, Mizuta E, Manabe K, Bahrudin U, Morikawa K, Arakawa K, Sasaki N, Igawa O, Shigemasa C, Yamamoto Y, Morisaki T, Hidaka K, Kurata Y, Yoshida A, Shiota G, Higaki K, Ninomiya H, Lee JK, Shirayoshi Y, Hisatome I: Changes of HCN gene expression and I(f) currents in Nkx2.5-positive

cardiomyocytes derived from murine embryonic stem cells during differentiation. *Biomed Res* 29: 195-203, 2008.

- 2) Kado M, Lee J-K, Hidaka K, Miwa K, Murohara T, Kasai K, Saga S, Morisaki T, Ueda Y, Kodama I: Paracrine factors of vascular endothelial cells facilitate cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 377: 413-418, 2008
- 3) 森崎隆幸・日高京子 「ES 細胞の現状と問題点: 基礎と応用」 分子心血管病 (in press)

2. 学会発表

- 1) Kyoko Hidaka, Ryo Sugawa, Manabu Shirai, Yousuke Takahama, Takayuki Morisaki, Pharyngeal endoderm development from embryonic stem cells, 6th International Society for Stem Cell Research Annual Meeting (Philadelphia, PA, USA) 平成 20 年 6 月
- 2) 本多賢彦、日高京子、白井学、森崎隆幸 心臓形成期における Dishevelled 結合因子 Dact1 の発現解析、第 31 回日本分子生物学会 平成 20 年 12 月
- 3) 白井学、日高京子、若山貴成、森崎隆幸 細胞表面マーカーの発現パターンによる、心臓予定領域形成の詳細な解析 第 31 回日本分子生物学会 平成 20 年 12 月

れており、今回の結果が株の違いを反映しているのか、我々の分化誘導方法や培養方法に問題があったのかは不明であるが、このことを明らかにさせるためにも別の細胞株での分化誘導検討が必要であると思われる。分化誘導法としては、今回試した方法のほかには内胚葉系細胞 (END-2) との共培養も報告されており、この方法を含めて他の方法についても積極的に情報収集を行い、試してみる必要があるだろうと思われる。また、多種多様な分化条件や株の検討を行うためにも、効率の良い分化評価法が必須であると考えられた。次年度はこのことも踏まえて検討課題としたい。

E. 結論

本研究ではこれまでマウス ES 細胞で明らかになった血清除去による心筋への効率的分化誘導に加え、ヒト ES 細胞の心筋分化を検討したが、効率の良い分化誘導にはさらなる検討が重要であり、また、心筋分化が容易なヒト ES 細胞を用いて、その特徴の解析が今後必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yano S, Miake J, Mizuta E, Manabe K, Bahrudin U, Morikawa K, Arakawa K, Sasaki N, Igawa O, Shigemasa C, Yamamoto Y, Morisaki T, Hidaka K, Kurata Y, Yoshida A, Shiota G, Higaki K, Ninomiya H, Lee JK, Shirayoshi Y, Hisatome I: Changes of HCN gene expression and I(f) currents in Nkx2.5-positive

cardiomyocytes derived from murine embryonic stem cells during differentiation. *Biomed Res* 29: 195-203, 2008.

- 2) Kado M, Lee J-K, Hidaka K, Miwa K, Murohara T, Kasai K, Saga S, Morisaki T, Ueda Y, Kodama I: Paracrine factors of vascular endothelial cells facilitate cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 377: 413-418, 2008
- 3) 森崎隆幸・日高京子 「ES 細胞の現状と問題点: 基礎と応用」 分子心血管病 (in press)

2. 学会発表

- 1) Kyoko Hidaka, Ryo Sugawa, Manabu Shirai, Yousuke Takahama, Takayuki Morisaki, Pharyngeal endoderm development from embryonic stem cells, 6th International Society for Stem Cell Research Annual Meeting (Philadelphia, PA, USA) 平成 20 年 6 月
- 2) 本多賢彦、日高京子、白井学、森崎隆幸 心臓形成期における Dishevelled 結合因子 Dact1 の発現解析、第 31 回日本分子生物学会 平成 20 年 12 月
- 3) 白井学、日高京子、若山貴成、森崎隆幸 細胞表面マーカーの発現パターンによる、心臓予定領域形成の詳細な解析 第 31 回日本分子生物学会 平成 20 年 12 月

- 4) 若山貴成、日高京子、白井学、森崎隆幸、ES細胞由来心筋前駆細胞の表面マーカーによる単離と解析、第31回日本分子生物学会 平成20年12月
- 5) 宮本章子、日高京子、白井学、金谷信彦、森崎隆幸 骨格筋分化におけるRNA結合タンパク質遺伝子 Rbm24 および Rbm38 の機能解析 第31回日本分子生物学会 平成20年12月
- 6) 日高京子、須川涼、新田剛、白井学、高浜洋介、雨貝孝、森崎隆幸 マウスES細胞からの咽頭内胚葉の分化 第31回日本分子生物学会 平成20年12月
- 7) Kyoko Hidaka, Takayuki Morisaki Purification of ES cell-derived cardiomyocytes using cell surface markers 第6回心血管幹細胞研究会 平成21年1月
- 8) 日高京子、若山貴成、白井学、李鍾國、児玉逸雄、森崎隆幸 表面マーカーを用いたES細胞由来心筋細胞単離法の確立 第8回日本再生医療学会 平成21年3月
- 9) Kyoko Hidaka, Takanari Wakayama, Manabu Shirai, Takayuki Morisaki Isolation and characterization of ES-derived cardiac progenitor cells based on surface markers: Keystone Symposium: Cardiac Disease: Development, Regeneration, and Repair (Asheville, NC) 平成21年3月
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
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
Yano S, Miake J, Mizuta E, Manabe K, Bahrudin U, Morikawa K, Arakawa K, Sasaki N, Igawa O, Shigemasa C, Yamamoto Y, Morisaki T, Hidaka K, Kurata Y, Yoshida A, Shiota G, Higaki K, Ninomiya H, Lee JK, Shirayoshi Y, Hisatome I	Changes of HCN gene expression and I(f) currents in Nkx2.5-positive cardiomyocytes derived from murine embryonic stem cells during differentiation.	<i>Biomed Res</i>	29 卷	195-203	2008
Kado M, Lee J-K, Hidaka K, Miwa K, Murohara T, Kasai K, Saga S, Morisaki T, Ueda Y, Kodama I:	Paracrine factors of vascular endothelial cells facilitate cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	377 卷	413-418	2008
森崎隆幸・日高京子	ES 細胞の現状と問題点：基礎と応用	分子心臓血管病	in press		

Changes of HCN gene expression and I_f currents in Nkx2.5-positive cardiomyocytes derived from murine embryonic stem cells during differentiation

Shuichi YANO¹, Junichiro MIAKE², Einosuke MIZUTA², Kasumi MANABE², Udin BAHRUDIN², Kumi MORIKAWA², Keita ARAKAWA², Norihito SASAKI², Osamu IGAWA¹, Chiaki SHIGEMASA¹, Yasutaka YAMAMOTO², Takayuki MORISAKI³, Kyoko HIDAOKA³, Yasutaka KURATA⁴, Akio YOSHIDA², Goshi SHIOTA⁵, Katsumi HIGAKI⁶, Haruaki NINOMIYA⁷, Jong-Kook LEE⁸, Yasuaki SHIRAYOSHI² and Ichiro HISATOME²

¹ Department of Cardiovascular Medicine, Tottori University Faculty of Medicine; ² Division of Regenerative Medicine and Therapeutics, Department of Genetic Medicine and Regenerative Therapeutics, Institute of Regenerative Medicine and Biofunction, Tottori University Graduate School of Medical Science; ³ Department of Bioscience, National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka; ⁴ Department of Physiology, Kanazawa Medical College; ⁵ Division of Molecular and Genetic Medicine, Department of Genetic Medicine and Regenerative Therapeutics, Tottori University Graduate School of Medical Science; ⁶ Division of Functional Genomics, Research Center for Bioscience and Technology, Tottori University; ⁷ Department of Biological Regulation, Tottori University Faculty of Medicine; and ⁸ Department of Cardiovascular Research, Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University, Japan

(Received 30 April 2008; and accepted 26 May 2008)

ABSTRACT

Changes in the expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide (HCN)-gated channels and I_f currents during the differentiation of embryonic stem cells into cardiac cells remain unknown. We examined changes of HCN genes in expression and function during the differentiation of Nkx2.5-positive cardiac precursor cells derived from mouse ES cells using cell sorting, RT-PCR, immunofluorescence and whole cell patch-clamp techniques. Cs^+ -induced inhibition of automaticity and transcription of HCN genes increased during differentiation. Expressions of Nkx2.5, a marker of cardiac progenitor cell, and Flk1, a marker of hemangioblast, were mutually exclusive. Messenger RNA and proteins encoded by HCN1 and 4 genes were predominantly observed in Nkx2.5-positive cells on day 15, although Flk1-positive cells did not express genes of the HCN family on that day. Cs^+ -induced prolongation of the cycle of spontaneous action potentials and I_f currents were predominantly observed on day 15. These results suggested that a fraction of Nkx2.5-positive cardiac precursor cells was committed to pacemaker cells expressing I_f channels predominantly encoded by HCN 1 and 4 genes.

Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels (I_f channels) encoded by a family of four

HCN genes (HCN1-4) are widely expressed in heart cells (3) and neurons (21). I_f channels are best known for their prime role in the generation of automaticity in cardiac pacemaker cells in the adult sinus node and Purkinje system (3, 6, 17). Rabbit cardiac sinoatrial nodal cells express HCN1 mRNA together with strongly expressed HCN4 mRNA (7, 16) and rabbit Purkinje fibers contain almost equal amounts of HCN1 and HCN4 transcripts together with a small amount of HCN2 mRNA (23).

The activity of I_f channels is almost negligible in the adult ventricle, while the transcripts of HCN2

Address correspondence to: Ichiro Hisatome, MD, PhD, Division of Regenerative Medicine and Therapeutics, Department of Genetic Medicine and Regenerative Therapeutics, Institute of Regenerative Medicine and Biofunction, Tottori University Graduate School of Medical Science, 86 Nishi-chou, Yonago 683-8504, Japan
Tel: +81-859-38-6441, Fax: +81-859-38-6440
E-mail: hisatome@med.tottori-u.ac.jp

and 4 are detected in the whole heart (8, 9, 24) together with traces of HCN3 mRNA (11). In contrast, I_f channels are present in the ventricle during the embryonic and perinatal stages: these currents have been observed in chick embryonic ventricle and cultured ventricular cells isolated from newborn rats as well as in differentiated adult rat ventricular cells (2, 9, 15, 16, 18, 20, 23). However, there are controversial reports regarding the developmental changes of I_f and HCN gene transcription. Yasui *et al.* reported that in mouse embryonic ventricles, HCN1 and 4 were predominantly expressed on day 9.5, while HCN2 was predominantly expressed in the neonatal period (27). This subtype switching appeared to underlie the attenuation of I_f activity and automaticity that takes place during embryogenesis. A recent large-scale analysis of ion channel expression in the mouse heart demonstrated that HCN1, 2 and 4 increased during development (4). However, the changes of I_f and HCN gene transcription during cardiac differentiation remain to be elucidated.

Automaticity is the most prominent characteristic of cardiomyocytes derived from ES cells, which can easily generate beating cardiac muscle by forming embryo-like cell aggregates called embryoid bodies (EBs). Using an ES cell differentiation system, it is possible to trace the cardiovascular differentiation process at the cellular level. Tracking the markers of stem cells is an appropriate technique to evaluate developmental changes of cardiac progenitor cells. Flk1, for instance, has been reported to be predominantly expressed in the lateral mesoderm and is a marker of hemangioblasts (25). Nkx2.5 (5) is expressed in the cardiac primordium, beginning in the cardiogenic mesoderm before alpha-actin and alpha-myosin heavy chain genes develop; thus, it is a marker of cardiac progenitor cells. Nkx2.5-positive cells (Nkx2.5/GFP(+)) cells are cardiac precursor cells derived from ES cells whose expression of GFP is driven by an Nkx2.5 promoter; these cells differentiate into sinus node- or conducting system-type cells as well as into myocytes (5). Since Nkx2.5-positive cells may differentiate into cells of any cardiac precursor lineage during heart development, Nkx2.5 expression can be used to identify various types of cardiomyocyte precursors in a mixture of ES cells. In the present study, we investigated changes in HCN genes and protein expression, Cs⁺-sensitive automaticity and I_f channel currents during differentiation of Nkx2.5-positive cardiac precursor cells derived from murine ES cells through EBs formation *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Culture of Nkx2.5/GFP(+) ES cells. Ht7 is an ES cell line derived from 129/Ola cells. Ht7 cells carry a hygromycin resistance gene in one of the Oct-3/4 loci, which allows selection of Oct-3/4-positive undifferentiated stem cells (5). Hcgp7 cells are Nkx2.5/GFP knock-in ES cells derived from Ht7 cells and carry the GFP reporter gene in one of the Nkx2.5 loci (14). Cells were grown and maintained on gelatinized dishes without feeder cells in Glasgow-modified Eagle's medium (GMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS, #6K0357; Equitech-Bio Inc., Kerrville, TX), 1 × non-essential amino acids (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.1 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 g/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin, 100 µg/mL hygromycin (Gibco-BR, Carlsbad, CA), and 1000 units/mL leukemia inhibitory factor (LIF) (ESGRO™; Chemicon International Inc., Temecula, CA). Differentiation of both Ht7 and Hcgp7 cells was induced through formation of EBs. Briefly, EBs were generated by plating 20 µL of cell suspension (final concentration of 2.5×10^4 cells/mL of growth medium: GMEM containing 10% FCS, 0.1 mg/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin, and 0.1 mM 2-mercaptoethanol) on Petri dishes, followed by incubation in hanging drops for 2 days. Sixty EBs were transferred to Petri dishes together with 10 mL of the growth medium and cultured as floating EBs until dissociation for FACS analysis. We used mainly floating EBs or cells sorted from floating EBs for most of the analyses. For experiments shown in Fig. 1A, embryoid bodies were transferred onto gelatin-coated dishes on day 5 and cultured to observe spontaneous beating.

Fluorescence-activated cell sorting. EB cells were dissociated by trypsinization and gentle pipetting, then resuspended in Hank's Balanced Salt Solution containing 1% bovine serum albumin and subjected to flow cytometry (EPICS XL; Beckman Coulter, Fullerton, CA) using WinMDI software. The sort gate for GFP(+) cells was established on the basis of the forward-scattered light, side-scattered light, and GFP fluorescence intensity of control ES cells (Ht7 cells). Hcgp7 cells were sorted into culture medium and reanalyzed to estimate purity. Typically, about 5×10^5 GFP(+) cells (Nkx2.5-positive cells) were obtained from 1×10^7 cells from EBs harvested on day 8. Flk1(+) cells (Flk1-positive cells) were also identified using anti-Flk1 antibody and PE-con-

jugated antibody and were subsequently sorted into culture medium and reanalyzed to estimate purity. Typically, about $3-4 \times 10^5$ Flk1(+) cells were obtained from 1×10^7 cells from EBs harvested on day 8.

Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Messenger RNA was collected from EBs on days 5, 7, 10 and 15 of their differentiation. For the analysis of mRNA in GFP(+) cells, the cells were obtained from EBs harvested on day 7 and sorted; then, they were further cultured on gelatin-coated dishes and analyzed on days 7 and 15 of their differentiation. Total RNA was isolated from EBs or sorted cells using an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. RNA samples were treated with DNaseI (Promega, Madison, WI) to eliminate genomic DNA contamination, and cDNA was synthesized using SuperScript™ II reverse transcriptase (Gibco-BRL). Real-time PCR was performed using a Light Cycler SYBR Green I kit according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) and products were analyzed employing an ABI PRISM R 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster, CA). The gene-specific primers used in the experiments are shown in Table 1. PCR products were also separated by gel electrophoresis, stained with ethidium bromide and visualized in the UV transilluminator.

Electrophysiological recordings. Action potentials (APs) and I_f currents in GFP(+) cells were measured on days 7 and 15 of their differentiation using the patch-clamp technique (5, 12, 13). APs and I_f currents were recorded employing an Axopatch-200B amplifier (Axon Instruments). Command voltage

pulse generation, data acquisition, and data analysis were performed using pCLAMP9 software (Axon Instruments). All experiments were carried out at 37°C.

APs were recorded according to the perforated-patch technique under current clamp mode. Cells were perfused with normal Tyrode's solution. The pipette solution contained (in mM) 140 K aspartate, 5 MgCl₂, 5 K₂ATP, 5 EDTA, 5 HEPES, and 250 µg/mL amphotericin B; pH was adjusted to 7.2 with KOH. Membrane perforation was monitored by changes in capacitance transients (*i.e.* changes in series resistance) in the voltage clamp mode. APs were triggered by application of 3 ms current pulses of 1 nA.

Whole cell I_f currents were recorded using the ruptured-patch technique under the voltage clamp mode. Cells were perfused with an external solution containing (in mM) 135 NaCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 10 D-glucose, 2 CaCl₂, 5.4 KCl, 2 BaCl₂, and 0.2 CdCl₂ (pH 7.4 with NaOH). The internal pipette solution contained (in mM) 130 K-glutamate, 1 MgCl₂, 15 KCl, 5 NaOH, 5 HEPES, and 5 Mg-ATP (pH 7.3 with KOH). The recording pipettes had a tip resistance of < 5 MΩ when filled with the internal solution. To minimize voltage errors, recordings were not made until the series resistance became < 15 MΩ. The average cell membrane capacitance was 34.5 ± 3.5 pF (mean ± S.E.) in cells from EBs harvested on day 7, and 41.0 ± 4.8 pF (mean ± S.E.) in those from EBs harvested on day 15. I_f currents were elicited by 3 s hyperpolarizing pulses (from -130 to -40 mV) from a holding potential of -50 mV. An I_f activation curve was constructed from the amplitude of time-dependent inward currents measured at the end of the test pulses. I_f values were normalized to the current ampli-

Table 1 Sequences of oligonucleotides used as real time RT-PCR primers

Target	Accession number		Sequence (5'→3')	Size of PCR product (bp)
β-actin	X03672	Left Primer	CAACCGTGAAAAGATGAC	238
		Right Primer	CAGGATCTTCATGAGGTAGT	
HCN1	NM_010408	Left Primer	CTCCACTTTGATCTCCAGAC	253
		Right Primer	TTCTGCATCTGGGCTGTAT	
HCN2	HM_008226	Left Primer	GACAATTTCAACGAGGTGCT	199
		Right Primer	CCATCTCACGGTCATATTTG	
HCN3	HM_008227	Left Primer	AACCCCTCCATGCCAGCCTAT	177
		Right Primer	TTCCAGAGCCTTTACGCCT	
HCN4	AF_064874	Left Primer	CGACAGCGCATCCATGACTA	211
		Right Primer	GCTGGAAGACCTCGAAACGC	

RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction

tude at -130 mV and fitted by Boltzmann's equation

$$I_f = 1 / \{1 + \exp[(V_m - V_{1/2})/k]\}, \quad (1)$$

where V_m is the membrane voltage, $V_{1/2}$ is the voltage at the half-maximal activation, and k is the slope factor.

Immunofluorescence. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min at 4°C and made permeable with 0.1% TritonX-100 for 10 min at 4°C . They were washed three times with PBS and treated with a blocking buffer (0.1% Triton X-100, 2% skim milk in PBS) at room temperature for 1 h. Anti-HCN1 and 4 (Alamone Lab, Jerusalem, Israel) staining of fixed cells was performed as described previously (13) using Alexa546-conjugated anti-mouse or anti-goat IgG (Alexa) as a secondary antibody, respectively. The nuclei were stained with DAPI. Images were collected employing a Bio-Rad MRC1024 confocal microscope.

Statistical analysis. For statistical analysis, one-way analysis of variance (ANOVA) and repeated measures analysis of variance (two-way ANOVA) were

carried out. All data are expressed as the mean \pm SE, with $P < 0.05$ being considered statistically significant.

RESULTS

Cs⁺-sensitivity of automaticity and transcription of HCN genes during EBs differentiation

Figure 1A shows the effect of the authentic I_f inhibitor Cs^+ on spontaneous beating of EBs on days 7 and 15 of their differentiation. In the presence of 2 mM Cs^+ , the frequency of spontaneous beating decreased by $40 \pm 10\%$ (mean value: 98 beats/min to 58 beats/min) in EBs on day 15, whereas at the same concentration Cs^+ barely affected their beating on day 7 (mean value: 64 beats/min to 57 beats/min). Since I_f currents encoded by HCN gene play a pivotal role in Cs^+ -sensitive automaticity (3), we examined the transcription of HCN genes in EBs during their differentiation. Figure 1B shows the transcription of the HCN gene family (HCN1 to 4) in EBs on days 5, 7, 10 and 15 of their differentiation. The transcription of all HCN genes significantly increased, while beta-actin expression did not change over the entire phase of differentiation (data

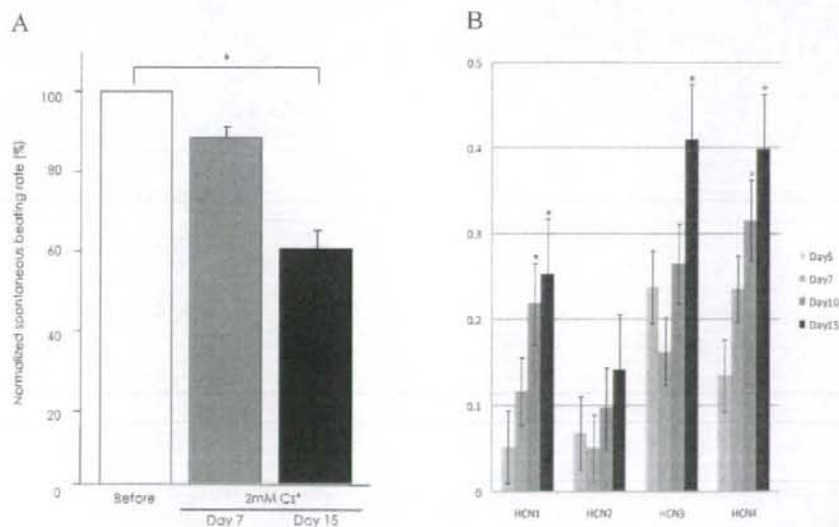


Fig. 1 Changes in Cs^+ -sensitive automaticity and level of HCN gene transcription in EBs during their differentiation. **A:** Beating rates of EBs formed by Hcgp7 cells on days 7 and 15 of their differentiation in the presence and absence of 2 mM Cs^+ . Before: before the addition of CsCl (open column). 2 mM Cs^+ : in the presence of 2 mM CsCl . Values are the mean \pm SE of 15 independent experiments. * $P < 0.05$. **B:** Level of HCN gene transcription in EBs formed by Hcgp7 cells at the indicated time points during their differentiation. Y-axis indicates the normalized mRNA. Values are expressed as the mean \pm SE of 15 independent experiments. * $P < 0.05$.

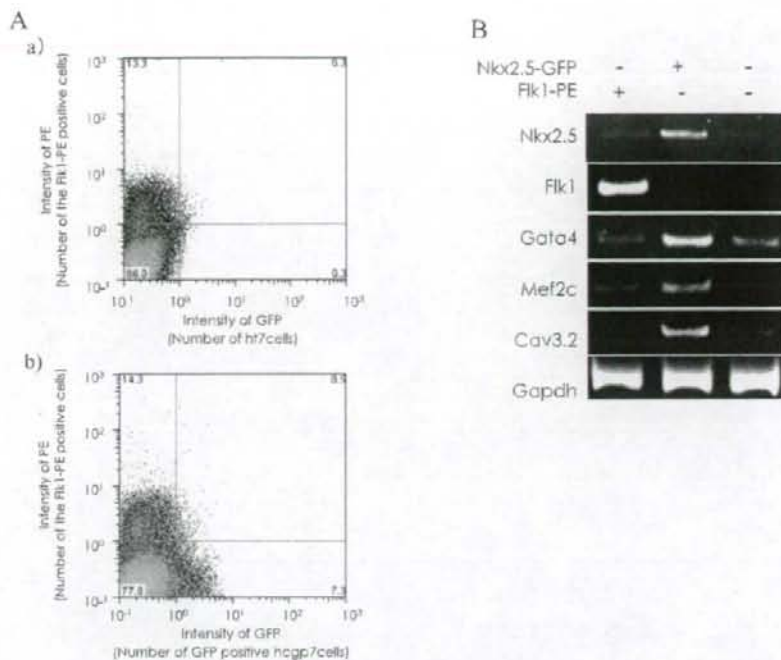


Fig. 2 Distribution of Nkx2.5-positive cells and Flk1-positive cells and gene expression. A: FACS Analysis of Flk1-positive and Nkx2.5/GFP(+) cells derived from EBs harvested on day 7 of their differentiation. Panel a), control H7 ES cells. Panel b), Flk1(+) cells (14.3% of all cells) and Nkx2.5/GFP(+) cells (7.3% of all cells) were identified by FACS analysis. B: Transcripts of cardiac specific genes in purified Nkx2.5-positive cells, Flk1-positive cells and double negative cells. Cells were sorted by FACS, and then mRNA was extracted from them. Each band corresponds to the transcript amplified using the indicated primers. (+): positive cell fraction, (-): negative cell fraction.

not shown).

Distribution of Nkx2.5/GFP(+) cells and Flk1(+) cells in EBs

In EBs, spontaneous beating cells responsive to Cs^{2+} include cardiomyocytes as well as other types of differentiated cells. Therefore, we examined the distribution of Nkx2.5/GFP(+) cardiac precursor cells in EBs based on the GFP fluorescence intensity of control H7 ES cells (Fig. 2Aa). It has recently been reported that Flk1-positive mesoderm cells give rise to spontaneous beating cardiomyocytes when cultured on OP9 stroma cells (25), suggesting the possibility that Flk1-positive cells (Flk1(+) cells) might be present in the population of Nkx2.5/GFP(+) cells. Our preliminary data indicated that the transcription of Flk1 started on day 4.5 to reach a steady level on day 7 and that of Nkx2.5 started on day 5.5 to reach a steady level on day 8.5 of the EBs differentiation (data not shown). As shown in Fig. 2Ab, on day 7

most Nkx2.5/GFP(+) cells did not overlap with the population of Flk1(+) cells. Fig. 2B shows the fluorescence intensity of the transcripts of cardiac specific genes in various fractions of sorted cells. Nkx2.5/GFP(+)-Flk1(-) cells expressed Nkx2.5, Gata4, Mef2c, and the T-type Ca^{2+} channel Cav3.2, which is consistent with our previous reports (12, 13). Nkx2.5/GFP(-)-Flk1(+) cells expressed mainly Flk1 and Gata4, and to a less extent Nkx2.5 and Mef2c, but they did not express Cav3.2; whereas, Nkx2.5/GFP(-)-Flk1(-) cells expressed Gata4 alone. These results suggested that the populations of Nkx2.5/GFP(+) and Flk1(+) cells were for the most part mutually exclusive.

Transcriptional level and immunoreactivity of HCN genes in Nkx2.5-positive cells

We purified Nkx2.5/GFP(+) cells from EBs harvested on days 7 and 15, and analyzed the level of HCN gene transcription by RT-PCR. Figure 3A

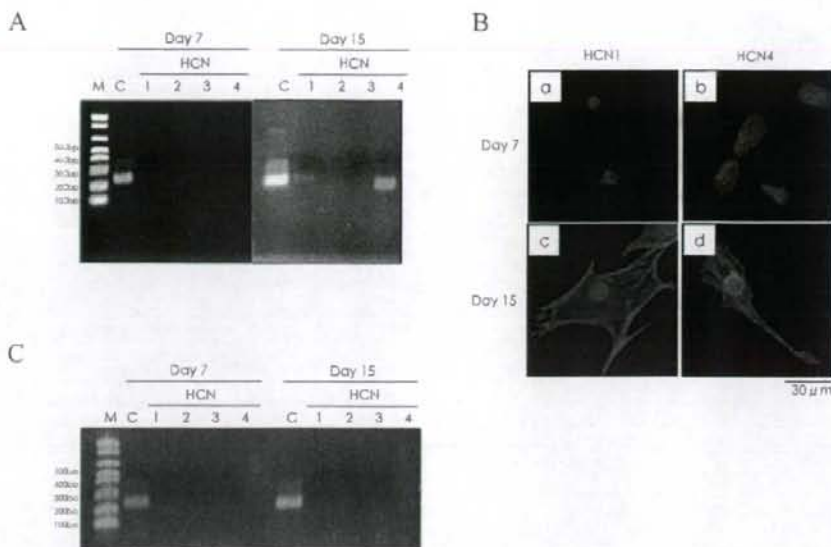


Fig. 3 Transcription and expression of HCN genes in Nkx2.5-positive cells and Flk1-positive cells on days 7 and 15 of their differentiation. **A:** Transcription of HCN genes in Nkx2.5/GFP(+) cells on days 7 and 15 of their differentiation. Cells were sorted by FACS, and then mRNA was extracted from them. M: Molecular marker, C: β -actin, 1: HCN1, 2: HCN2, 3: HCN3, 4: HCN4. **B:** Protein expression of HCN1 and 4 in Nkx2.5/GFP(+) cells on days 7 and 15 of their differentiation. **a** and **b**): Nkx2.5/GFP(+) cells on day 7. **c**) and **d**): Nkx2.5/GFP(+) cells on day 15. Shown are representative images obtained employing a confocal microscope. Cells were sorted by FACS, then fixed and stained with the indicated antibody (red signal). Nuclei were stained using DAPI (blue signal). **C:** Transcripts of HCN genes in purified Flk1(+) cells on days 7 and 15 of their differentiation. Cells were sorted by FACS, and then mRNA was extracted from them. M: Molecular marker, C: β -actin, 1: HCN1, 2: HCN2, 3: HCN3, 4: HCN4.

shows the transcripts of HCN genes in Nkx2.5/GFP(+) cells. The bands at the predicted size of HCN1 and HCN4 genes were detected in Nkx2.5/GFP(+) cells from EBs harvested on day 15, although these transcripts were not detected in these cells on day 7. The immunoreactivity of HCN1 and 4 proteins was also detected in Nkx2.5/GFP(+) cells on day 15 of their differentiation (Fig. 3Bc, d), but not on day 7 (Fig. 3Ba, b). On the other hand, as shown in Fig. 3C, Flk1(+) cells did not express HCN gene transcripts on day 7 nor on day 15 under the differentiation conditions of these experiments, indicating that Nkx2.5/GFP(+) cells but not Flk1(+) cells experienced changes in the expression of HCN genes during their differentiation under the present experimental conditions.

Cs⁺-sensitive automaticity and I_T currents in Nkx2.5-positive cells during differentiation

Figure 4A shows the effects of extracellular Cs^+ (2 mM) on action potentials (APs) in Nkx2.5/GFP(+) cells on days 7 and 15 of their differentiation. Cs^+

at 2 mM prolonged the cycle of spontaneous APs in the cells from EBs harvested on day 15 (panel b), but it had little effect on automaticity in the cells from EBs harvested on day 7 (panel a). The data obtained from multiple experiments (Fig. 4B) indicated that Cs^+ at 2 mM prolonged the cycle of spontaneous APs by $126.2 \pm 50.3\%$ (from 406.6 ± 77.2 ms to 851.1 ± 163.5 ms, $P < 0.05$) in cells from day 15, but only by $15.3 \pm 6.7\%$ (from 874.6 ± 176.5 ms to 1022 ± 221.2 ms, $P < 0.05$) in cells from day 7. We then compared the density and kinetics of I_T currents in Nkx2.5/GFP(+) cells on days 7 and 15 of their differentiation. I_T currents were not detected on day 7 of cell differentiation (data not shown), but they were significantly activated on day 15 (Fig. 4C) and comparable with the data of Cs^+ -induced changes in APs in Nkx2.5/GFP(+) cells from day 15. The activation curve was determined by measuring tail currents at +15 mV upon fully activating I_T currents by applying 3 s hyperpolarizing voltage steps ranging from -40 to -130 mV, yielding a $V_{1/2}$ of -96.2 ± 2.2 mV and slope factor of 9.1 ± 0.7 (Fig. 4D).