

ジナルのクローン番号とサブクローン番号の両方を含むよう命名すべきであるとも提言している。現在、世界中の研究室でiPS細胞の樹立が進められており、その株数は数年のうちに数万という値に達することが予想される。シリアル番号やIDをつけていくとしたら、このような莫大な細胞株数に対応できるものでなければならない。アラビア数字のみではなく、アルファベットなどの文字や記号とアラビア数字を組み合わせることでIDを表記すれば、細胞株数が膨大になっても対応できるのではないかと山中所長ら⁴⁾は提案している。

ヒトES/iPS細胞の既存の細胞株について

山中所長ら⁴⁾は、すでに世界中に広く知られている細胞株(例：201B7, hFIB2-iPS2)に新規にシリアル番号などで設定し直す場合にも、オリジナルの名称およびクローンIDを継承することができるような柔軟性をもたせるべきであると提言している。オリジナルの名称から細胞株の情報や原著論文を簡単に収集できるなど、研究者にとって都合が良い点が多いとしている⁴⁾。すでに独自の方式で命名し、細胞株を管理している研究機関は多いため、すべての研究機関の樹立細胞株に対して公平にIDを分配するには多くの困難が予想される。しかし、集積された細胞情報や研究成果を活用するためにも、国際規格のIDを公平に付与できるよう整備し、細胞株のデータベース化を推進していく必要があるのではないだろうか。

すべての多能性幹細胞へ適応

ISCRの提案は、図の(c)の部分には、“i”あるいは“e”を表記することによりその細胞株がヒトiPS細胞株とヒトES細胞株のいずれかであることを識別できるようにするというものである³⁾。この点に関して、山中所長らとPollok所長ら両者ともに、マウスiPS細胞、体細胞核移植ES細胞(NT-ESC)、単為発生胚由来ES細胞(parthenogenetic-ESC)、胚性腫瘍細胞(embryonal carcinoma cell : ECC)、胚性生殖系細胞(em-

bryonal germ cell : EGC)、エピプラスト幹細胞(epiblast stem cell : EpiSC)などの多能性細胞をすべてこの命名法規定の対象に含めるべきであり、これらを正確に識別できるよう動物種や由来細胞を表すコードを図の(c)に表記することを提案している⁴⁾⁵⁾。しかし、筆者らは、細胞種を識別するコードを頭につけたほうが分類しやすいのではないかと考える(図)。

ヒトES/iPS細胞において特定の病名を表すのは適当ではない

名称に病名を含めることに関して、Pollok所長ら⁵⁾は懸念を抱いている。多くのヒトiPS細胞は、新生児表皮線維芽細胞(neonatal foreskin fibroblasts)から人工的に誘導され、“正常(non-diseased)”な指標細胞としても使用されている。しかしながら、組織を採取する段階でドナーの異常を検出できることは難しく、その匿名性からドナーの病歴の追跡は不可能である。現段階では、ヒトES/iPS細胞や分化させた細胞の病気にに対する感受性を明らかにすること(どのような病気になりやすいかを予測すること)も不可能である。細胞登録の際にはドナーの病歴などに関する情報もわかっている範囲で報告すべきであるが、遺伝子の変異や欠失などの確定された情報の表記を提案している。

ヒトES/iPS細胞を培養する現場での作業

山中所長ら⁴⁾とPollok所長ら⁵⁾は両者とも、細胞株の名称に使用する文字数はできるだけ短くするよう主張している。データベース上で管理する際の利便性も重要だが、現場での作業も考慮するべきである。培養デッシュや凍結チューブにグローブをした手で書きやすく、読み取りやすくすることが重要である。ATCCで1.5mLチューブを用いる場合、細胞株の名称が10文字以下であることが理想的であるとPollok所長ら⁵⁾は述べている。山中所長ら⁴⁾も、ISCRの提案した14文字³⁾は不便を感じる長さであり、簡略化した名称を使用し始めるようになることを危惧する。簡略化した名

表1 海外の細胞登録サイト

	機関	アドレス
Stem Cell Registry	ISCI	http://www.stem-cell-forum.net/ISCF/initiatives/isci/stem-cell-registry/
ISCR	UMass	http://www.umassmed.edu/iscr/index.aspx
hESCreg	EU連携	http://www.hescreg.eu/
NIH Human Embryonic Stem Cell Registry	NIH	http://grants.nih.gov/stem_cells/registry/current.htm

ISCI : The International Stem Cell Initiative

ISCR : The International Stem Cell Registry

UMass : The University of Massachusetts Medical School, Human Stem Cell Bank and Registry

hESCreg : European Human Embryonic Stem Cell Registry

称の使用は、細胞の混同のリスクにつながる。医薬基盤研JCRB細胞バンクや理化学研究所バイオリソースセンター細胞バンクでは、場合によってバーコードラベルを用いて管理している。最近では安価なバーコードリーダーもあり、研究室レベルにおいても利用が可能ではないだろうか。

これまでに命名法が規定され、広く活用されている例がある³⁾。分化抗原群は、“CD42a”“CD42b”のようにCD番号で表記され、個別の抗原が認識される。また、遺伝子や蛋白質などについてはさまざまな名称が使用されるが、データベースに登録されたアクセッション番号によって識別され、容易にその原著論文まで確認できる。利便性の高い命名法の策定とデータベースの構築を行い、現場のニーズに対応する鍵となるのが、やはり細胞登録システムの整備である。細胞株の名称やIDとともに細胞情報を登録し、管理していくことが必要であろう。

ヒトES/iPS細胞の登録

ヒトES/iPS細胞を樹立した際、具体的な報告方法に関する国際的な統一規定はなく、新規の細胞の樹立を含めた研究成果の報告項目などは研究者やジャーナルの査読者に任されている。今後、産業応用される可能性があることから、各国の倫理規定を尊重して共有できるよう倫理的妥当性および科学的合理性を将来にわたって確保することが肝要である。表1の記載の通

り、海外のヒトES細胞については、ISCBI, EUヒトES細胞登録(European Human Embryonic Stem Cell Registry : hESCreg)が連携して、それぞれのホームページで公開をしている。また、NIHヒトES細胞登録(NIH Human Embryonic Stem Cell Registry)では、NIHの研究費を使用して研究が可能な細胞が掲載されている。細胞登録に必要な情報として、表2に示す5つの項目が提案されている³⁾⁸⁾。このようなヒトES/iPS細胞の情報整備は、新規細胞株の樹立に必要な基本データ作成とその情報公開の推進につながると思われる。

おわりに

幹細胞研究者の方々には、細胞樹立の際に前記の問題をご一考いただければ幸いである。一方で、幹細胞研究者らの声をさらに集約し、想定される問題を回避し、かつ利便性の高い命名法を早期に確立することが望まれる。ES/iPS細胞株を含む多能性幹細胞の命名法および発表に関するルールを設け、情報をデータベース化し、世界中で共有することは、幹細胞研究の推進につながる。本総説が日本の幹細胞研究推進の一助となれば幸いである。

謝辞

ヒトiPS細胞研究に関与している独・医薬基盤研のすべての皆様に感謝します。なお、ヒトES, iPS細胞

表2 ES/iPS細胞の登録や研究成果の報告の際に必要な情報

<p>細胞株の由来 (source)</p> <p>細胞のタイプ, 由来組織, 継代数など ドナーから採取された場合: ドナーの年齢, 性別, 人種 (自己報告または解析結果)* 細胞バンクや民間企業から入手した場合: 細胞株のアクセッション番号</p>
<p>樹立方法 (derivation method)</p> <p>細胞の株化までの方法, 培地および添加物, 培養期間, 継代数など詳細な培養方法 ES細胞の場合: 胚の取り扱い方法, 胚盤胞を得るための透明帯除去方法, 胚盤胞からの内部細胞塊の単離方法 iPS細胞の場合: リプログラミングに用いたベクターシステム, 低分子, 蛋白質, mRNAやmiRNAとその導入・誘導方法</p>
<p>細胞特性 (characterization)</p> <p>未分化状態の確認 (免疫染色, フローサイトメトリー, 遺伝子発現プロファイリングなど) 多能性の確認 (<i>in vitro</i> 分化, テラトーム形成, 遺伝子発現プロファイリングなど) 核型, SNP (一塩基多型) によるゲノム解析結果*</p>
<p>細胞同一確認 (genetic identity) と無菌性 (sterility)</p> <p>STR (short tandem repeat) やSNP解析による細胞認証試験結果* 無菌試験結果およびマイコプラズマ否定試験結果</p>
<p>細胞の来歴 (provenance)</p> <p>ドナーに対する説明および同意 (インフォームド・コンセント), 利益相反についての確認</p>

研究者から提供される細胞株の情報を名称・登録番号と合わせて管理していくべきだが, 特に個人を特定できる情報 (*) は, 各国の倫理規定を尊重し, 慎重に管理されなければならない。

に関する本研究は, 厚生労働省科学研究費補助金によりサポートされています。

●文 献

- 1) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al : Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282** : 1145-1147, 1998
- 2) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131** : 861-872, 2007
- 3) Luong MX, Auerbach J, Crook JM, et al : A call for standardized naming and reporting of human ESC and iPSC lines. *Cell Stem Cell* **8** : 357-359, 2011
- 4) Higashi H, Brüstle O, Daley G, et al : The nomenclature system should be sustainable, but also practical. *Cell Stem Cell* **8** : 606-607, 2011
- 5) Rust W, Pollok B : Reaching for consensus on a naming convention for pluripotent cells. *Cell Stem Cell* **8** : 607-608, 2011
- 6) The International Stem Cell Initiative : Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotech* **25** : 803-816, 2007
- 7) Narva E, Autio R, Rahkonen N, et al : High-resolution DNA analysis of human embryonic stem cell lines re-

- veals culture-induced copy number changes and loss of heterozygosity. *Nat Biotech* **28** : 371-377, 2010
- 8) The International Stem Cell Banking Initiative : Consensus guidance for banking and supply of human embryonic stem cell lines for research purposes. *Stem Cell Rev* **5** : 301-314, 2009
- 9) Crook J, Hei D, Stacey G : The International Stem Cell Banking Initiative (ISCB): raising standards to bank on. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **46** : 169-172, 2010
- 10) Ye L, Chang JC, Lin C, et al : Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106** : 9826-9830, 2009
- 11) Galende E, Karakikes I, Edelmann L, et al : Amniotic fluid cells are more efficiently reprogrammed to pluripotency than adult cells. *Cell Reprogram* **12** : 117-125, 2010
- 12) Park IH, Arora N, Huo H, et al : Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* **134** : 877-886, 2008
- 13) Kazuki Y, Hiratsuka M, Takiguchi M, et al : Complete genetic correction of iPSC cells from Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther* **18** : 386-393, 2009
- 14) Röehme D : Quantitative Cell Fusion : The fusion sensitivity (FS) potential. *J Cell Sci* **49** : 87-97, 1981

マウス ES 細胞由来神経堤細胞の毒性評価系応用への可能性

三村 純代^{1,2)}、相原 祐子³⁾、木村 直大⁴⁾、菅 三佳¹⁾、平田みつひ¹⁾、林 洋平³⁾、
浅島 誠^{3,5)}、岡本 哲治⁴⁾、二川 浩樹²⁾、古江一楠田 美保¹⁾

¹⁾ 独立行政法人 医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 培養資源研究室

²⁾ 広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 口腔健康科学専攻 口腔生物学分野

³⁾ 東京大学大学院 総合文化研究科 生命環境科学系

⁴⁾ 広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻 先進医療開発科学講座 分子口腔医学・顎顔面外科学

⁵⁾ 独立行政法人 産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター

要約 口唇口蓋裂は先天異常のひとつであるが、その原因のひとつに妊娠時服用の薬剤による影響が考えられている。しかし、口唇口蓋裂を予測できる *in vitro* 毒性評価法が開発されていない。顎顔面領域の発生メカニズムが十分に解明されれば、*in vitro* アッセイ系を確立できると考えられる。我々は、マウス胚性幹 (ES) 細胞から顎顔面領域の発生に重要な神経堤への分化誘導を検討した。その結果、既知の成分からなる無血清培地を用いた二次元培養により、マウス ES 細胞から神経上皮を経て神経堤へ分化誘導するプロトコールの開発に成功した。我々の開発した二次元分化誘導法は添加因子の影響を正確に解析でき、顎顔面領域の発生メカニズムの解明や毒性評価法の開発に寄与できる可能性が期待できる。ここで、その方法について概説する。

キーワード： 神経堤、ES 細胞、無血清培養、BMP4

序 文

口唇口蓋裂は、顎顔面領域でもっとも頻度の高い先天異常のひとつである。日本人においては出生児1,000人につき1.82~2.06人の割合で発症する。病因は遺伝的因子と環境的因子が関与する多因子関説が有力とされており、妊娠時服用の薬剤による影響もそのひとつであると考えられている。妊

娠時服用薬剤の影響は発生毒性試験により予測評価されている。主に実験動物を用いて行われているが、近年、国内外で毒性試験の動物実験代替法が検討されている。特に EU では多くの試験に対する動物実験使用廃止が進んでいる。マウス胚性幹 (ES) 細胞^{1,2)} から心筋への分化を指標とした *in vitro* 発生毒性試験法である Embryonic Stem Cell Test (EST 法) が代替法として利用されているが、口唇口蓋裂の毒性を予測することができる *in vitro* アッセイ系はまだ、開発されていない。顎顔面領域発生メカニズムを解明するための *in vitro* アッセイ系が確立されていないからと考えられる。顎顔面領域は主に神経堤に由来する細胞の誘導作

連絡者：古江一楠田美保

独立行政法人 医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 培養資源研究室

〒567-0085 茨木市彩都あさぎ7-6-8

TEL:072-641-9819、FAX:072-641-9851

E-mail: mkturue@nibio.go.jp

用により形成される。神経堤は脊椎動物の原腸形成期後期に神経板と非神経外胚葉の間に現れる細胞集団で、神経管閉鎖後、神経管の背側から上皮間葉移行 (EMT) を行いながら体内を遊走し様々な細胞に分化するため、第四の胚とも言われる。神経堤は、頭尾軸方向の位置によって頭部神経堤と体幹部神経堤に大きく分類されるが、頭部神経堤細胞からは、頭部の末梢神経細胞やグリア細胞、表皮色素細胞、平滑筋細胞、軟骨細胞や骨細胞などに分化し、体幹部神経堤細胞からは主に色素細胞、脊髄神経節や交感神経節、副腎髄質などの末梢神経細胞へ分化する³⁾。神経堤は、一時的でびまん性に存在するためにその研究がなかなか進まなかった。近年、ES 細胞から神経堤への分化誘導法が報告されつつある。その多くが細胞を凝集させて三次元構造 (胚様体、EB) を構築させるものであるが、今回、我々は単層培養にて神経堤細胞に分化誘導する方法を開発した⁴⁾ ので概説する。

1. 細胞外マトリックス (ECM) の分化への影響

笹井らのグループは、ES 細胞から神経堤細胞への分化誘導法の最初の報告として、SDIA 法を発表した⁵⁾。SDIA 法は、マウスの間質細胞である PA6 細胞をフィーダー細胞として ES 細胞を共培養させる方法である。誘導因子の添加のタイミングや組み合わせによって、神経堤細胞だけでなく種々のニューロンに分化誘導できることから、神経系細胞を得る際に幅広く用いられている方法でありヒト ES 細胞にも応用されている⁶⁻¹⁴⁾。しかし、フィーダー細胞から分泌される因子が同定されおらず、添加因子との相互作用が発生する可能性がある。また、血清を使用している場合にはロット差が発生する。近年、細胞外マトリックス (ECM) を使用することで、フィーダー細胞を代替した培養を求める動きが強まっている¹⁵⁾。ECM

の1つであるマトリジェル (BD 社製) を用いた神経系細胞への分化誘導法も報告されている¹⁶⁻¹⁹⁾。しかし、マウス Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) 肉腫の抽出物であるマトリジェルは、ラミニンや IV 型コラーゲン、エンタクチンの ECM 成分だけでなく、FGF-2、EGF、PDGF、TGF β などといった増殖因子、その他タンパク質などを含有する複雑な組成であり^{20,21)}、ロット差もあるため、添加因子の効果を正確に解析できない。

我々は、必要最少成分からなる分化用無血清培地 ESF5²²⁾ および未分化維持培地 ESF7²²⁾ を用いたマウス ES 細胞の未分化維持培養法と単層培養による分化誘導法を開発し、ECM や増殖因子の効果について解析を進めた。これらの培地は必要最少の既知の組成となっており、血清などの動物由

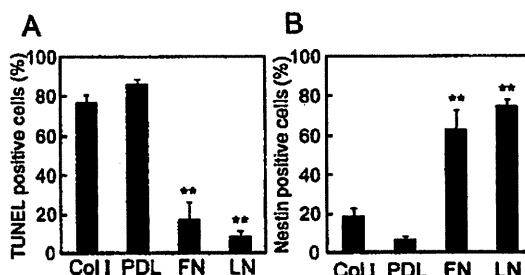


図1 ECMの違いがES細胞の生存や分化に与える影響 (Int. J. Dev. Biol. 54: 1287-1294 (2010) より改変)

コラーゲンI (Col I; 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)、ポリ-D-リジン (PDL; 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)、フィブロネクチン (FN; 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)、またはラミニン (LN; 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 上で10 ng/ml の FGF-2 を含む ESF5培地にてマウス ES 細胞を6日間培養した。(A): TUNEL 染色陽性率。割合の値は各 ECM 上で6日間培養したマウス ES 細胞 350個以上から計測し、平均値 \pm 標準誤差を示す (n=5)。(B): 神経幹細胞マーカーNestin のタンパク発現陽性率。Nestin の発現は抗 Nestin 抗体による免疫染色で検出した。割合の値は6日間培養したマウス ES 細胞350個以上から計測し、平均値 \pm 標準誤差を示す (n=5)。

LN 上で培養した場合にマウス ES 細胞の生存率、神経系への分化効率が最も高い。**p<0.01。

来成分も含まないため、添加因子の解析に適している。血清を用いて培養を行ったマウス ES 細胞は血清の影響が3継代後まで残ると言われており^{23,24)}、ESF7 培地で継続的に未分化維持培養を行ったマウス ES 細胞 D3 株 (ES-D3 細胞) を用いて、神経系への分化誘導における細胞外マトリックスの影響を検討した (図1)。未分化維持には有効であった I 型コラーゲンやポリ-D-リジン²⁵⁾ を用いるとアポトーシスを引き起こし、神経幹細胞へ分化しなかった。一方、LIF 存在下にも分化を示したラミニンやフィブロネクチン上においては、マウス ES 細胞はアポトーシスを生じず、Nestin 陽性細胞へと分化した。in vitro 二次元無血清培養においては、ECM は重要であり、その種類によって分化を制御していることが明らかとなった。

2. 神経系細胞への分化に対する FGF-2 の効果

FGF-2 は神経幹細胞の細胞増殖促進因子であり、マウス ES 細胞の神経幹細胞への分化誘導によく用いられている^{26,27)}。一方、FGF-2 が神経外胚葉細胞への分化を抑制し、非神経系細胞の増殖を促進する²⁸⁾ という、神経系への分化に対して逆の作用も報告されており、問題となっている。こういった結果の相違は、分化誘導する際に EB を形成させることや、使用する培地に含まれる因子の組み合わせによって細胞内シグナルが複雑に組み合わせられることから生じたと考えられる。

我々は、必要最少成分からなる分化用培地 ESF5 培地に FGF-2 (10 ng/ml) と FGF-2 のコファクターであるヘパリン (100 ng/ml) を添加し、ラミニンをコートしたプレート上で ES-D3 細胞を単

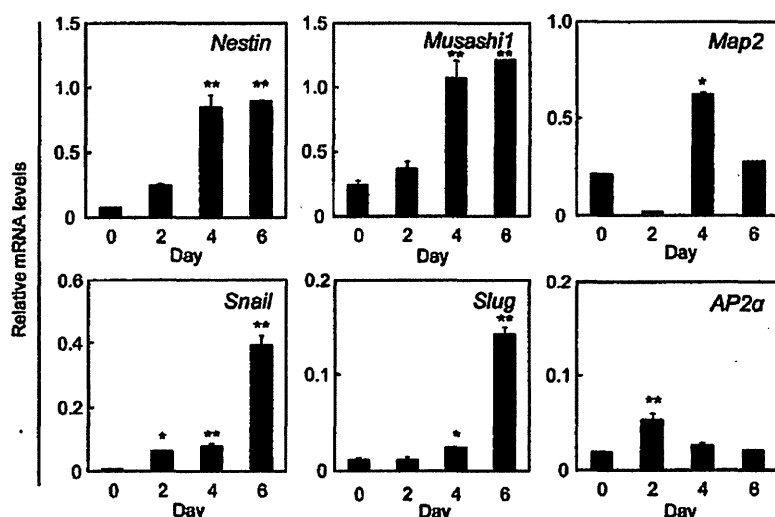


図2 神経系細胞のマーカ遺伝子の発現に対する FGF-2 の効果 (Int. J. Dev. Biol. 54: 1287-1294 (2010) より)

LN (2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 上で 10 ng/ml の FGF-2 を含む ESF5 培地にてマウス ES 細胞を培養し、2日毎に神経堤マーカー (*Snail*, *Slug*, *AP2 α*)、神経前駆細胞マーカー (*Nestin*, *Musashi1*)、および神経細胞マーカー (*Map2*) の mRNA 発現量を比較した。各 mRNA の発現量は *GAPDH* mRNA の発現量に対する相対値として、リアルタイム PCR 法により求め、E10.5 日のマウス胎児における各 mRNA 発現量を 1 として示した。値は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=5)。*p<0.05, **p<0.01、培養0日目と比較。

層培養して、神経系マーカー遺伝子の解析を行った(図2)。その結果、4日目には神経幹/前駆細胞マーカーである *Nestin* や *Musashi1*、神経細胞の樹状突起のマーカーである *MAP2* の発現量が増加した。6日目には神経堤マーカーのうち EMT に関連する遺伝子 *Snail* および *Slug* の発現量が増加した。発生初期の神経堤マーカーである *AP-2α* は2日目に増加し、その後減少した。*AP-2α* は神経管閉鎖時に外胚葉と頭部神経堤細胞に一過性に発現する重要な遺伝子³⁹⁾ であるので、FGF-2 の添加による分化誘導は *in vivo* での発生過程を部分的に再現していると考えられるが、神経堤マーカーの発現量増加の割合はマウス胎児頭部と比較して非常に低い。つまり、FGF-2 の添加によりマウス ES 細胞を神経系の細胞に分化誘導できるが、神経堤細胞へ分化誘導するには FGF-2 と合わせて他に何らかの因子が必要であることが我々の実験により示唆された。

3. 神経堤細胞への分化に関する誘導因子

生体内では、隣接する組織から分泌される複数の因子が相互作用をして神経堤を誘導する。トリでは、神経板から神経堤やその他の神経管を形成する細胞を誘導するのに BMP シグナルが必要十分であり^{30,31)}、神経堤へ誘導の際の維持³²⁾ や、神経管から神経堤に遊走する³³⁾ のに重要な役割を果たす。Wnt シグナルは、*in vitro* において神経堤を多量に誘導するのに必要十分であり、またトリでは *Wnt6* が非神経外胚葉に発現し³⁴⁾ 神経堤の形成に関与している³⁵⁾ と言われている。しかし、アフリカツメガエルにおいては、神経堤の誘導には BMP シグナルの抑制と Wnt シグナルの活性化の組み合わせで神経堤が誘導され³⁶⁻³⁸⁾、ゼブラフィッシュでの神経堤細胞の特定は BMP シグナルの濃度勾配と Wnt シグナルの相互作用によって行われる³⁹⁻⁴¹⁾。一方、BMP シグナルと TGFβ シグナル

を抑制することで、ヒト ES 細胞から神経堤細胞に分化誘導する方法が報告された¹⁷⁾。また最近では、これらのシグナルの抑制と Wnt シグナルの活性化を同時に行うことにより、神経幹細胞の分化過程を経由せずに ES 細胞から直接的に神経堤細胞に分化誘導する報告もされた¹⁹⁾。この結果は、ヒトにおける *in vivo* での神経堤誘導過程では神経

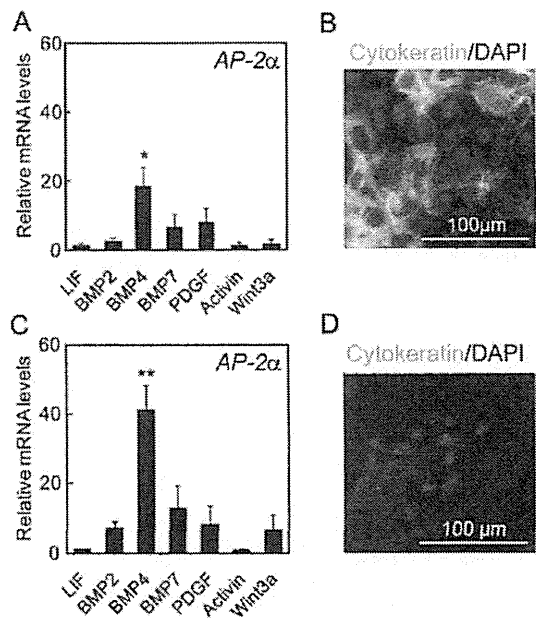


図3 神経堤細胞のマーカー遺伝子の発現に対する増殖因子の効果 (Int. J. Dev. Biol. 54: 1287-1294 (2010) より改変)

LN 上で10 ng/ml の FGF-2を含む ESF5培地にてマウス ES 細胞を2日間 (A、B)、または4日間 (C、D) 培養した後、さらに種々の増殖因子と10 ng/ml の FGF2を含む ESF5培地で2日間培養を続けた。

(A、C) : 10 ng/ml の各増殖因子と10 ng/ml の FGF2を含む ESF5培地で培養したマウス ES 細胞における *AP2α* の mRNA 発現量。LIF 添加培養時の mRNA 量を1として示す。

(B、D) : 10 ng/ml の BMP4と10 ng/ml の FGF2を含む ESF5培地で培養したマウス ES 細胞における上皮細胞マーカー、サイトケラチンの免疫染色像。

Bars, 100 μm. 値は平均値 ± 標準誤差を示す (n=3)。*p<0.05、**p<0.01。

幹細胞を介さない可能性も考え得る。しかし、これらの誘導法は血清の代替物である Knockout serum replacement (KSR) を用いているため、他のシグナルとのクロストークが関与している可能性がある。KSR は BMP4 様の活性があることがこれまでに報告されている²⁴⁾。そのほかにも様々な活性が予測されるが、組成が明らかにされていないため不明である。

神経堤細胞を誘導する因子を探索するために、我々は、ラミニンを用いた単層培養の系で、FGF-2 を添加した ESF5 培地にて 2 日間培養した条件と、4 日間培養した条件に、FGF-2 とともに種々の増殖因子 (LIF, BMP2, BMP4, BMP7, PDGF, Activin, Wnt3a) を添加した ESF5 培地にて培養し、神経堤細胞への分化誘導に最適な条件を検討した (図 3)。2 日間培養後に FGF-2 とともに BMP4 を添加した場合、サイトケラチン陽性の上皮系細胞が多く見られ (図 3B)、*AP-2 α* の発現増加も少なく (図 3A)、神経堤細胞に分化しない神経上皮細胞が大半を占める結果となる。4 日間培養後に、FGF-2 とともに BMP4 を添加して培養すると *AP-2 α* の発現が顕著に増加した (図 3C, D)。他の増殖因子ではこのような効果は観察されなかった。このように、胚発生において神経堤が形成する際に関与する因子を二次元培養下で解析するには、各因子の組み合わせ、濃度、添加のタイミングなどを詳細に検討する必要がある。

4. 神経堤の発生に関わる遺伝子群

神経堤細胞で発現する遺伝子は EMT に関連する遺伝子が多い。*Snail* は神経堤や中胚葉で発現する転写因子であり、原腸陥入中の EMT を制御している。*Snail* は神経堤の発生では、遊走前の神経堤に発現し、層間剥離を促進することで *Sox9* と協働して神経上皮細胞に EMT を誘導することと、アポトーシスを抑制することの主に 2 つの機能を

有する。*Slug* は *Snail* と機能は基本的に似ているが、マウスでは遊走前神経堤細胞に発現せずむしろ遊走中に発現し^{42,43)}、神経堤の特定に関与しない点が *Slug* に特徴的な機能である。またマウスやラットの発生中、*Slug* は最初第一鰓弓へ遊走中の頭部神経堤細胞で強く発現し、遊走後の頭蓋顔面の神経堤由来細胞で発現が維持されることも言われている⁴³⁾。哺乳類の *Twist* ファミリーには *Twist1* と *Twist2* があり、そのうち神経堤に関与するのは *Twist1* である。*Twist1* は胚発生中の EMT や癌転移のマスターレギュレーターであり、神経管からの遊出や、鰓弓への遊走、心臓神経堤細胞の遊走に関与する。また、神経堤由来細胞にも発現し、頭部間葉や第一鰓弓、頭蓋円蓋にも発現する。*Sox9* は、神経堤や耳ブラコードや軟骨、骨の発生時に発現する遺伝子である。神経堤の発生では、*Sox9* は遊走前神経堤細胞に発現し、*Slug* のプロモーターを一部活性化することにより EMT を引き起こすと言われている。*Sox10* は、神経堤の発生のあらゆる段階で極めて重要な制御因子として働く転写因子であり、神経堤の発生中に背側神経管の予定神経堤領域で早期に発現したのちに、遊走中の神経堤細胞や神経堤由来の腸神経系や末梢神経系前駆細胞や黒色素細胞系に発現する。*Pax3* は、神経堤細胞マーカーのうち最も早期のマーカーであり⁴⁴⁾、その後の *Snail* や *Sox* ファミリー、*AP2* といった遺伝子の発現を誘導し、これらの因子は互いに制御し合っている⁴⁵⁾。たいていは分化すると遊走神経堤細胞から *Pax3* の発現は消失するが、メラノサイトでは発現する。*p75* は、低親和性神経栄養因子受容体 (*p75^{NTR}*) であり膜糖タンパク質である。神経堤では、背側神経管から分離する初期に発現する⁴⁶⁾。*P0* は、末梢神経のミエリン鞘を構成するイムノグロブリンスーパーファミリーの接着分子であり^{47,48)}、ミエリン形成シュワン細胞だけではなく非ミエリン形成シュワン細胞にも発現することからシュワン細胞のマ

カーとして用いられるが、遊走中の神経堤細胞にも発現することが知られている⁴⁹⁻⁵²⁾。しかし、これらのマーカーは、神経堤だけではなく他の組織にも発現し、神経堤細胞の絶対的なマーカーとは言えないため、分化誘導された細胞を確認するには、複数のマーカーを同定する必要がある。

5. 二次元培養のメリット

神経分化誘導にもっともよく用いられてきた方法は、ES細胞を凝集させて胚様体 (embryoid body: EB) として浮遊培養を行って分化誘導する三次元培養法である^{26,28)}。機能性細胞を誘導できる発生過程を模倣できる良い方法であると考えられている。しかし、培養基材などにより改善されつつあるが、EBの大きさを正確にコントロールすることが難しく⁵³⁾、その大きさの差が分化誘導効率の差に影響すると言われている。一方、ES細胞をシングルセルにして播種する二次元培養法を用いた方法であれば、経時的に細胞数を測定することも可能であり、再現性を確認できる。また、二次元培養法であれば、分化による形態変化を顕微鏡下に観察できるという利点がある。ES細胞から神経堤細胞への分化誘導では、未分化状態から神経幹細胞、神経堤細胞、また神経細胞やグリア細胞のように、特徴的な細胞形態を有する細胞への変化を経時的に観察できる。二次元培養法を用いることで、ES細胞からの初期の分化段階の細胞形態を評価することができ、また発現するマーカータンパクの局在も明確に観察することができる。以上の観点から、二次元分化誘導法は添加因子の影響を解析するなど、薬効評価や毒性評価などの目的には有用であると考えられる。

6. 毒性評価系への課題

マウス ES細胞の分化を用いた評価系は、マウ

ス胚を用いた発生過程との相関性を検証できるため、現状においては有用なアッセイ系である。一方で、「種差の壁」の限界があり、ヒト特異的に起こる毒性についての予測性は十分とはいえない。口唇口蓋裂などの顎顔面領域における奇形誘発毒性を予測するための評価系は、ヒト生体機能を反映できるものであること、安定的に生産・供給できること等の要件が満たすことが求められる。さらに、利便性・汎用性、また実験動物使用制限、時間とコスト削減などの観点から、よりヒト生体組織に近い性質・機能を有した培養細胞を用いたハイスループット薬剤副作用検証法の開発が期待される。今回、マウス ES細胞からの神経堤誘導を行ったが、やはりヒト培養細胞を用いた分化誘導系が望ましい。ヒト ES細胞を用いた毒性評価系構築に期待が高まっているが、まだ、解決されていない倫理的問題や特許上の問題などがある。様々な体細胞から作製できるヒト iPS細胞は、個人差を網羅するライブラリーを作成することが可能であり、新規 *in vitro* 毒性評価系の最適なツールとなりうる。一方、間葉系幹細胞 (MSC) も多能性が報告されている。口腔領域においては骨髓へのアプローチが近く、MSCの採取が他科に比べて容易である。我々は既知の組成からなる無血清培地を用いてヒト MSCの未分化性維持に成功した⁵⁴⁾ (図4)。現在は、MSCから神経堤への誘導を検討中である。顎骨骨髓由来 MSCから神経堤細胞へリプログラムが可能であれば、由来組織から考慮しても、期待されるツールと考えられる。

マウス ES細胞とヒト ES細胞、ヒト MSCでは、シグナル要求性が異なっており、そのため未分化性の維持に必要な因子も異なっている^{22,54,55)}。よって、神経堤細胞への分化誘導においても、マウスとヒトでは要求されるシグナルが異なる可能性が十分に予想される。ヒト細胞を用いた二次元培養による分化誘導法において誘導因子や ECMの要求性が解明できれば、ヒト発生におけるメカ

マウス ES 細胞由来神経堤細胞

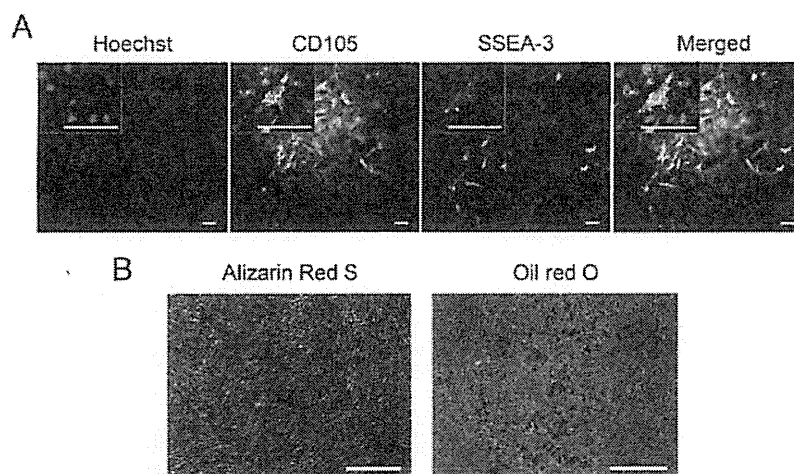


図4 無血清培地を用いたヒト間葉系幹細胞の未分化維持培養 (Int. J. Dev. Biol. 55: 181-187 (2011) より改変) ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 UE7T-13を未分化性維持用無血清培地 D-hESF10にて未分化状態で7継代培養した (A) 後に、骨芽細胞や脂肪細胞への分化を誘導した (B)。
 (A) : UE7T-13細胞は未分化マーカーSSEA-3と間葉系幹細胞マーカー CD105の両方を発現した。Bars、100 μm 。
 (B) : 骨芽細胞分化培地で20日間培養すると骨芽細胞 (Alizarin Red S 染色) へ、脂肪細胞分化培地で24日間培養すると脂肪細胞 (Oil Red O 染色) へ分化した。Bars、500 μm 。

ニズムの解析に貢献できることが予想される。現在我々の研究室ではヒト ES・iPS 細胞からの分化誘導法を開発中である。

費、ならびに、厚生労働省科学研究費補助金によりサポートされています。

おわりに

二次元培養下にマウス ES 細胞から神経堤細胞へ分化誘導の有用性と課題について概説した。生体との相関性を確認するためにもマウス ES 細胞を用いたアッセイ系は有用であり、毒性評価系構築へ応用していきたいと考えている。

謝辞

マウス ES 細胞からの神経堤誘導法開発において、慶応大学 岡野榮之教授、芝田晋介先生、名越慈人先生のご指導に深く感謝いたします。また、長岡技術科学大学 大沼清准教授のご協力に深く感謝いたします。本研究は、文部科学省科学研究

文 献

- 1) Evans, M. J. and Kaufman, M. H.: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154-156, 1981.
- 2) Martin, G. R.: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78, 7634-7638, 1981.
- 3) Le Douarin, N. M., Calloni, G. W. and Dupin, E.: The stem cells of the neural crest. *Cell Cycle*, 7, 1013-1019, 2008.
- 4) Aihara, Y., Hayashi, Y., Hirata, M., Ariki, N., Shibata, S., Nagoshi, N., Nakanishi, M., Ohnuma, K., Warashina, M., Michiue, T., Uchiyama, H., Okano, H., Asashima, M. and Furue, M. K.: Induction of neural crest cells from mouse embryonic stem cells in a serum-free monolayer culture. *Int J Dev Biol*, 54, 1287-1294, 2010.
- 5) Mizuseki, K., Sakamoto, T., Watanabe, K., Muguruma, K., Ikeya, M., Nishiyama, A., Arakawa, A., Suemori, H., Nakatsuji, N., Kawasaki, H., Murakami, F.

- and Sasai, Y.: Generation of neural crest-derived peripheral neurons and floor plate cells from mouse and primate embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 5828–5833, 2003.
- 6) Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y., Nakanishi, S., Nishikawa, S. I. and Sasai, Y.: Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron*, 28, 31–40, 2000.
 - 7) Ooto, S., Haruta, M., Honda, Y., Kawasaki, H., Sasai, Y. and Takahashi, M.: Induction of the differentiation of lentoids from primate embryonic stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44, 2689–2693, 2003.
 - 8) Buytaert-Hoefen, K. A., Alvarez, E. and Freed, C. R.: Generation of tyrosine hydroxylase positive neurons from human embryonic stem cells after coculture with cellular substrates and exposure to GDNF. *Stem Cells*, 22, 669–674, 2004.
 - 9) Takagi, Y., Takahashi, J., Saiki, H., Morizane, A., Hayashi, T., Kishi, Y., Fukuda, H., Okamoto, Y., Koyanagi, M., Ideguchi, M., Hayashi, H., Imazato, T., Kawasaki, H., Suemori, H., Omachi, S., Iida, H., Itoh, N., Nakatsuji, N., Sasai, Y. and Hashimoto, N.: Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J Clin Invest*, 115, 102–109, 2005.
 - 10) Ko, J. Y., Park, C. H., Koh, H. C., Cho, Y. H., Kyhm, J. H., Kim, Y. S., Lee, I., Lee, Y. S. and Lee, S. H.: Human embryonic stem cell-derived neural precursors as a continuous, stable, and on-demand source for human dopamine neurons. *J Neurochem*, 103, 1417–1429, 2007.
 - 11) Song, J., Lee, S. T., Kang, W., Park, J. E., Chu, K., Lee, S. E., Hwang, T., Chung, H. and Kim, M.: Human embryonic stem cell-derived neural precursor transplants attenuate apomorphine-induced rotational behavior in rats with unilateral quinolinic acid lesions. *Neurosci Lett*, 423, 58–61, 2007.
 - 12) Elkabetz, Y., Panagiotakos, G., Al Shamy, G., Socci, N. D., Tabar, V. and Studer, L.: Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes Dev*, 22, 152–165, 2008.
 - 13) Freed, W. J., Chen, J., Backman, C. M., Schwartz, C. M., Vazin, T., Cai, J., Spivak, C. E., Lupica, C. R., Rao, M. S. and Zeng, X.: Gene expression profile of neuronal progenitor cells derived from hESCs: activation of chromosome 11p15.5 and comparison to human dopaminergic neurons. *PLoS One*, 3, e1422, 2008.
 - 14) Pomp, O., Brokhman, I., Ziegler, L., Almog, M., Korngreen, A., Tavian, M. and Goldstein, R. S.: PA6-induced human embryonic stem cell-derived neurospheres: a new source of human peripheral sensory neurons and neural crest cells. *Brain Res*, 1230, 50–60, 2008.
 - 15) Xu, C., Inokuma, M. S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J. D. and Carpenter, M. K.: Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 19, 971–974, 2001.
 - 16) Yao, S., Chen, S., Clark, J., Hao, E., Beattie, G. M., Hayek, A. and Ding, S.: Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 6907–6912, 2006.
 - 17) Chambers, S. M., Fasano, C. A., Papapetrou, E. P., Tomishima, M., Sadelain, M. and Studer, L.: Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol*, 27, 275–280, 2009.
 - 18) Greber, B., Coulon, P., Zhang, M., Moritz, S., Frank, S., Muller-Molina, A. J., Arauzo-Bravo, M. J., Han, D. W., Pape, H. C. and Scholer, H. R.: FGF signalling inhibits neural induction in human embryonic stem cells. *EMBO J*, 2011.
 - 19) Menendez, L., Yatskievych, T. A., Antin, P. B. and Dalton, S.: Wnt signaling and a Smad pathway blockade direct the differentiation of human pluripotent stem cells to multipotent neural crest cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 19240–19245, 2011.
 - 20) Kleinman, H. K., McGarvey, M. L., Hassell, J. R., Star, V. L., Cannon, F. B., Laurie, G. W. and Martin, G. R.: Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry*, 25, 312–318, 1986.
 - 21) Kleinman, H. K. and Martin, G. R.: Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol*, 15, 378–386, 2005.
 - 22) Furue, M., Okamoto, T., Hayashi, Y., Okochi, H., Fujimoto, M., Myoishi, Y., Abe, T., Ohnuma, K., Sato, G. H., Asashima, M. and Sato, J. D.: Leukemia inhibitory factor as an anti-apoptotic mitogen for pluripotent mouse embryonic stem cells in a serum-free medium without feeder cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 41, 19–28, 2005.
 - 23) Wiles, M. V. and Johansson, B. M.: Embryonic stem cell development in a chemically defined medium. *Exp Cell Res*, 247, 241–248, 1999.
 - 24) Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I. and Smith, A.: BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, 115, 281–292, 2003.
 - 25) Hayashi, Y., Furue, M. K., Okamoto, T., Ohnuma,

マウス ES 細胞由来神経堤細胞

- K., Myoishi, Y., Fukuhara, Y., Abe, T., Sato, J. D., Hata, R. and Asashima, M.: Integrins regulate mouse embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells*, 25, 3005–3015, 2007.
- 26) Okabe, S., Forsberg-Nilsson, K., Spiro, A. C., Segal, M. and McKay, R. D.: Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech Dev*, 59, 89–102, 1996.
- 27) McKay, R.: Stem cells in the central nervous system. *Science*, 276, 66–71, 1997.
- 28) Li, M., Pevny, L., Lovell-Badge, R. and Smith, A.: Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. *Curr Biol*, 8, 971–974, 1998.
- 29) Mitchell, P. J., Timmons, P. M., Hebert, J. M., Rigby, P. W. and Tjian, R.: Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis. *Genes Dev*, 5, 105–119, 1991.
- 30) Liem, K. F., Jr., Tremml, G., Roelink, H. and Jessell, T. M.: Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell*, 82, 969–979, 1995.
- 31) Liem, K. F., Jr., Tremml, G. and Jessell, T. M.: A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell*, 91, 127–138, 1997.
- 32) Selleck, M. A., Garcia-Castro, M. I., Artinger, K. B. and Bronner-Fraser, M.: Effects of Shh and Noggin on neural crest formation demonstrate that BMP is required in the neural tube but not ectoderm. *Development*, 125, 4919–4930, 1998.
- 33) Sela-Donenfeld, D. and Kalcheim, C.: Regulation of the onset of neural crest migration by coordinated activity of BMP4 and Noggin in the dorsal neural tube. *Development*, 126, 4749–4762, 1999.
- 34) Garcia-Castro, M. I., Marcelle, C. and Bronner-Fraser, M.: Ectodermal Wnt function as a neural crest inducer. *Science*, 297, 848–851, 2002.
- 35) Wu, J., Saint-Jeannet, J. P. and Klein, P. S.: Wnt-frizzled signaling in neural crest formation. *Trends Neurosci*, 26, 40–45, 2003.
- 36) LaBonne, C. and Bronner-Fraser, M.: Neural crest induction in *Xenopus*: evidence for a two-signal model. *Development*, 125, 2403–2414, 1998.
- 37) Chang, C. and Hemmati-Brivanlou, A.: Neural crest induction by Xwnt7B in *Xenopus*. *Dev Biol*, 194, 129–134, 1998.
- 38) Saint-Jeannet, J. P., He, X., Varmus, H. E. and Dawid, I. B.: Regulation of dorsal fate in the neuraxis by Wnt-1 and Wnt-3a. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 13713–13718, 1997.
- 39) Barth, K. A., Kishimoto, Y., Rohr, K. B., Seydler, C., Schulte-Merker, S. and Wilson, S. W.: Bmp activity establishes a gradient of positional information throughout the entire neural plate. *Development*, 126, 4977–4987, 1999.
- 40) Nguyen, V. H., Trout, J., Connors, S. A., Andermann, P., Weinberg, E. and Mullins, M. C.: Dorsal and intermediate neuronal cell types of the spinal cord are established by a BMP signaling pathway. *Development*, 127, 1209–1220, 2000.
- 41) Dorsky, R. I., Moon, R. T. and Raible, D. W.: Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway. *Nature*, 396, 370–373, 1998.
- 42) Jiang, R., Lan, Y., Norton, C. R., Sundberg, J. P. and Gridley, T.: The Slug gene is not essential for mesoderm or neural crest development in mice. *Dev Biol*, 198, 277–285, 1998.
- 43) Savagner, P., Karavanova, I., Perantoni, A., Thiery, J. P. and Yamada, K. M.: Slug mRNA is expressed by specific mesodermal derivatives during rodent organogenesis. *Dev Dyn*, 213, 182–187, 1998.
- 44) Taneyhill, L. A. and Bronner-Fraser, M.: Dynamic alterations in gene expression after Wnt-mediated induction of avian neural crest. *Mol Biol Cell*, 16, 5283–5293, 2005.
- 45) Sauka-Spengler, T. and Bronner-Fraser, M.: A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 557–568, 2008.
- 46) Stemple, D. L. and Anderson, D. J.: Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell*, 71, 973–985, 1992.
- 47) Martini, R., Bollensen, E. and Schachner, M.: Immunocytological localization of the major peripheral nervous system glycoprotein P0 and the L2/HNK-1 and L3 carbohydrate structures in developing and adult mouse sciatic nerve. *Dev Biol*, 129, 330–338, 1988.
- 48) Lemke, G., Lamar, E. and Patterson, J.: Isolation and analysis of the gene encoding peripheral myelin protein zero. *Neuron*, 1, 73–83, 1988.
- 49) Barbu, M.: Molecular cloning of cDNAs that encode the chicken P0 protein: evidence for early expression in avians. *J Neurosci Res*, 25, 143–151, 1990.
- 50) Bhattacharyya, A., Frank, E., Ratner, N. and Brackenbury, R.: P0 is an early marker of the Schwann cell lineage in chickens. *Neuron*, 7, 831–844, 1991.
- 51) Zhang, S. M., Marsh, R., Ratner, N. and Brackenbury, R.: Myelin glycoprotein P0 is expressed at early stages of chicken and rat embryogenesis. *J Neurosci Res*, 40, 241–250, 1995.

- 52) Cheng, L. and Mudge, A. W.: Cultured Schwann cells constitutively express the myelin protein P0. *Neuron*, 16, 309–319, 1996.
- 53) Furue, M. K.: Standardization of human embryonic stem (ES) cell and induced pluripotent stem (iPS) cell research in Japan. *Tiss Cult Res Commun*, 28, 129–133, 2009.
- 54) Mimura, S., Kimura, N., Hirata, M., Tateyama, D., Hayashida, M., Umezawa, A., Kohara, A., Nikawa, H., Okamoto, T. and Furue, M. K.: Growth factor-defined culture medium for human mesenchymal stem cells. *Int J Dev Biol*, 55, 181–187, 2011.
- 55) Furue, M. K., Na, J., Jackson, J. P., Okamoto, T., Jones, M., Baker, D., Hata, R., Moore, H. D., Sato, J. D. and Andrews, P. W.: Heparin promotes the growth of human embryonic stem cells in a defined serum-free medium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 13409–13414, 2008.

(Accepted 15 January 2012)

Prospect of mouse embryonic stem cell-derived neural crest cells to *in vitro* assay for developmental toxicology

Sumiyo Mimura^{1,2)}, Yuko Aihara³⁾, Naohiro Kimura⁴⁾, Milka Suga¹⁾, Mitsui Hirata¹⁾, Yohei Hayashi³⁾, Makoto Asashima^{3,5)}, Tetsuji Okamoto⁴⁾, Hiroki Nikawa²⁾ and Miho Kusuda Furue¹⁾

¹⁾ Laboratory of Cell Cultures, Department of Disease Bioresources, National Institute of Biomedical Innovation, Osaka, Japan

²⁾ Department of Oral Biology & Engineering, Division of Oral Health Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan

³⁾ Department of Life Sciences (Biology), Graduate School of Arts and Sciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan

⁴⁾ Department of Oral Biology & Engineering, Division of Oral Health Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan

⁵⁾ Research Center for Stem Cell Engineering, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Ibaraki, Japan

Abstract: Cleft lip and palate which are the commonest congenital anomalies in the craniofacial region, in some cases, are considered to be caused by a medication a mother may have taken during her pregnancy. However, there is no reliable developmental toxicity screening test that can predict cleft lip and palate. Understanding the molecular mechanisms underlying craniofacial development would encourage the development of alternative *in vitro* embryo-toxicity tests and contribute to a decreased incidence of them. During craniofacial development, neural crest-derived mesenchymal cells contribute extensively to formation of maxillofacial structures. Using the growth factor defined serum-free culture adherent monolayer condition, we developed a protocol to promote mES cell differentiation into NC cells. In the culture conditions, the effect of exogenous factors can be analyzed without confounding influences of undefined components. This protocol could be used to help clarify the mechanisms underlying craniofacial development and to assist the development of *in vitro* alternative developmental toxicity test for drug-induced congenital anomalies in the craniofacial region.

Key words: neural crest, embryonic stem cells, serum-free culture, BMP4

Proteomic Analysis of Hepatitis C Virus (HCV) Core Protein Transfection and Host Regulator PA28 γ Knockout in HCV Pathogenesis: A Network-Based Study

Lokesh P. Tripathi,^{†,||} Hiroto Kambara,^{‡,||} Kohji Moriishi,[‡] Eiji Morita,[‡] Takayuki Abe,[‡] Yoshio Mori,[‡] Yi-An Chen,^{†,§} Yoshiharu Matsuura,[‡] and Kenji Mizuguchi^{*,†,§}

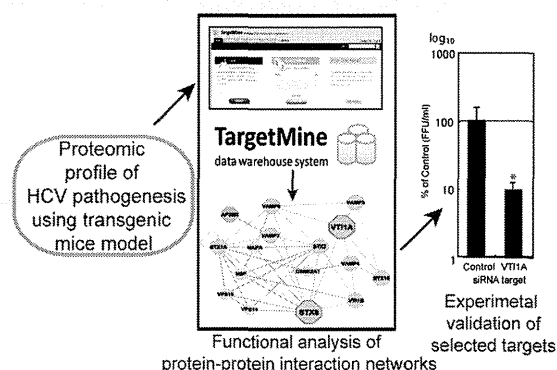
[†]National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Saito Asagi, Ibaraki, Osaka, 567-0085, Japan

[‡]Department of Molecular Virology, Research Institute for Microbial Diseases and [§]Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University, 3-1 Yamada-Oka, Suita, Osaka, 565-0871, Japan

Supporting Information

ABSTRACT: Hepatitis C virus (HCV) causes chronic liver disease worldwide. HCV Core protein (Core) forms the viral capsid and is crucial for HCV pathogenesis and HCV-induced hepatocellular carcinoma, through its interaction with the host factor proteasome activator PA28 γ . Here, using BD-PowerBlot high-throughput Western array, we attempt to further investigate HCV pathogenesis by comparing the protein levels in liver samples from Core-transgenic mice with or without the knockout of PA28 γ expression (abbreviated PA28 γ ^{-/-}CoreTG and CoreTG, respectively) against the wild-type (WT). The differentially expressed proteins integrated into the human interactome were shown to participate in compact and well-connected cellular networks. Functional analysis of the interaction networks using a newly developed data warehouse system highlighted cellular pathways associated with vesicular transport, immune system, cellular adhesion, and cell growth and death among others that were prominently influenced by Core and PA28 γ in HCV infection. Follow-up assays with *in vitro* HCV cell culture systems validated VTI1A, a vesicular transport associated factor, which was upregulated in CoreTG but not in PA28 γ ^{-/-}CoreTG, as a novel regulator of HCV release but not replication. Our analysis provided novel insights into the Core-PA28 γ interplay in HCV pathogenesis and identified potential targets for better anti-HCV therapy and potentially novel biomarkers of HCV infection.

KEYWORDS: CoreTG, GO, HCC, HCV, KEGG, OMIM, PA28 γ ^{-/-}CoreTG, PPI, siRNA, TargetMine



INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) is a prime cause of chronic liver disease frequently characterized by liver inflammation with accompanying steatosis, progressive fibrosis, and hepatocellular carcinoma (HCC) and infects nearly 3% of the world's population. HCV contains a single-stranded RNA genome encoding a 3000-amino-acid polyprotein, which is processed by host and viral factors to yield 10 viral proteins, Core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NSSA, and NSSB.¹⁻⁴ HCV variants are classified into six major genotypes with multiple subtypes characterized by phylogenetic heterogeneity, differences in infectivity, and interferon sensitivity.^{5,6} The availability of cell-culture-based systems for HCV infection has provided an increased understanding of HCV pathogenesis.^{5,7-9} Transgenic mice (preferably C57BL strain) expressing HCV proteins in the liver are also a preferred choice for the investigation of HCV pathogenesis.¹⁰ However, despite considerable research efforts, precise molecular mechanisms underlying HCV pathology remain unclear.

HCV Core protein (hereafter referred to as Core) is spliced from the polyprotein by the signal peptidase and further processed into a highly conserved 21-kDa mature form by the signal peptide peptidase; this processing facilitates its transfer to the detergent-resistant membrane fraction where virus replication and assembly take place. Core is a multifunctional protein implicated in RNA binding and as a pathogenic factor; it induces steatosis and HCC and, thus, liver failure.^{1,10} The ubiquitin-proteasome pathway, the premier intracellular protein degradation system in eukaryotes, is a key regulator of cellular processes and is also associated with the evasion of host immune response by many viruses, viral maturation, and progeny release.¹¹ Core binds to the proteasome activator PA28 γ in the nucleus and is degraded via a PA28 γ -dependent pathway. PA28 γ plays a crucial role in Core-induced insulin resistance, steatogenesis, and hepatocarcinogenesis and in HCV propagation; PA28 γ knockout in Core transgenic mice disrupts

Received: February 7, 2012

Published: May 31, 2012

steatosis and HCC, restores insulin sensitivity, and impairs viral particle production, and thus PA28 γ is a promising target for anti-HCV therapies with minimal side effects.^{2,12–13} However, the exact mechanisms through which PA28 γ facilitates Core-induced HCV pathogenesis remain poorly understood.

In this study, we aim to put forth biological networks that describe the differential expression of the host proteins and their likely roles in modulating PA28 γ function in HCV pathogenesis. We employed PowerBlot Western Array screening system, a high-throughput Western blotting method, to identify changes at the proteome level in Core expressing transgenic C57BL/6 mice with or without the knockout of PA28 γ gene expression (abbreviated PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTG and CoreTG, respectively). In our analysis, we included human protein interaction data and gene regulatory information for the differentially expressed proteins using TargetMine, an integrated data warehouse that we have developed recently.¹⁶ Our network-based analyses of the proteomic changes from the three data sets (CoreTGvsC57BL/6, PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTGvsC57BL/6 and PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTGvsCoreTG) provided novel insights into PA28 γ function in Core-induced HCV pathogenesis. Furthermore, we identified VTI1A, a vesicular transport associated factor, which was upregulated in CoreTG but not in PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTG, as a novel regulator of HCV release and, thus, an attractive target for anti-HCV therapy.

MATERIALS AND METHODS

Protein Sample Preparation

Protein samples were prepared from the livers of the C57BL/6 wild-type (hereafter referred to as WT) and the transgenic mice expressing HCV Core protein genotype 1b line C49 with (PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTG) or without (CoreTG) the knockout of PA28 γ expression.^{2,12} Livers were harvested from three individuals each of WT, CoreTG, and PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTG mice, and the harvested samples for each mice type were pooled together prior to protein sample preparation for PowerBlot analysis. The pooled liver samples of each mice type were homogenized in 1x sample buffer of SDS-PAGE on ice and then boiled for 5 min. The boiled sample was sonicated for the viscosity of DNA and employed for PowerBlot analysis.

PowerBlot Western Array Analysis

The levels of differentially expressed proteins were determined by the PowerBlot assay by BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA, USA). Briefly, samples containing 200 μ g of protein was loaded in one big well on top of a 4–15% gradient SDS-polyacrylamide gel and separated by electrophoresis (1.5 h at 150v). The proteins were transferred to Immobilon-FL membrane (Millipore, Billerica, MA, USA) for 2 h at 200 mA. After transfer, the membranes were incubated in the blocking buffer (LI-COR, Lincoln, NE, USA). The membrane was clamped with a Western blotting manifold that isolates 41 channels across the membrane. Each channel was incubated with a complex antibody cocktail for 1 h. The blots were removed from the manifold, washed, and hybridized for 30 min with secondary goat anti-mouse antibody conjugated to Alexa680 fluorescent dye (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Image data were captured using the Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR). Data analysis included the raw and normalized signal intensity data from each blot. The results were expressed as fold change that represented the protein changes, either increasing or decreasing in the comparative analysis between the experimental samples and the control.

The detected protein expression changes were listed in the order of confidence, 0 through 3, with 3 being the highest level of confidence, based on the signal quality. Only the data from confidence levels 2 and 3 (good quality signals; Supporting Information; Tables S1, S2a, S2b, and S2c) for proteins mapped to valid accessions were considered for further analysis. Proteins that displayed >1.8-fold change in abundance were judged to be differentially expressed, following the manufacturer's recommendation.

Human Orthologues for the Differentially Expressed Proteins

BD PowerBlot assay employs a cocktail of monoclonal antibodies that target human, mouse, and rat proteins, and in a specific study, over 90% were found to cross-react with proteins from human, mouse and rat¹⁷ (Table S1). Human orthologues for the proteins picked up by the antibody cocktail were retrieved from KEGG (Tables S2a, S2b, and S2c).

Construction of Protein–Protein Interaction Networks

PPIs for the human orthologues of each set of differentially expressed proteins were retrieved from BioGRID 3.1.74¹⁸ and iRefIndex 8.0¹⁹ databases along with the interactions between the primary interactors of the differentially expressed proteins using TargetMine.¹⁶ TargetMine is an integrated data warehouse that combines different biological data types and employs an objective protocol to prioritize candidate genes for further experimental investigation.¹⁶ The interactions were merged and filtered for redundancy to infer overall extended PPI networks. Protein identifiers used in the different databases were mapped to Entrez gene IDs and official gene symbols. The official gene symbols are used hereafter, to refer to the differentially expressed proteins (Table 1) and their interacting partners. All the relationships discussed should be interpreted as protein relationships unless otherwise clarified.

PPI Network Topological Analysis

Network components were visualized using Cytoscape 2.6,²⁰ while network properties such as *node degree distribution* and *shortest path* measures were computed using the Cytoscape NetworkAnalyzer plugin²¹ as described previously.²² In a PPI network, the degree of a node (protein) is defined as the number of nodes directly connected to (interacting with) it, i.e., its first neighbors. *Node degree distribution*, $P(k)$, is the number of nodes with a degree k for $k = 0, 1, 2, \dots$. The *shortest path length* between two nodes n and m , $L(n,m)$, is the minimal number of interactions that link proteins n and m in a PPI network. The *shortest path length distribution* is the number of node pairs (n,m) with $L(n,m) = x$ for $x = 1, 2, \dots$. The *average shortest path length*, also known as the *characteristic path length*, gives the expected distance between two connected nodes i.e. the minimal number of interactions that link any two proteins in a PPI network.

Functional Analysis by Characterization of Enriched Biological Associations

Gene ontology (GO) associations retrieved from GO consortium,²³ biological pathway data from KEGG (retrieved on March 1, 2011),²⁴ and disease phenotype associations from OMIM²⁵ were used to assign functional annotations to the constituents of the extended PPI networks. The proteins in each of the extended PPI networks were uploaded to TargetMine to create protein lists, and the enrichment of specific biological themes (GO terms, KEGG Pathways, OMIM phenotypes) associated with each PPI network was estimated

Table 1. Summary of PowerBlot Detected Protein Expression Levels in Protein Samples

CoreTGvsWT						altered protein levels in PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTGvsWT					
protein	gene ID	symbol	confidence level ^a	(-) under, (+) over ^b	fold change ^c	protein	gene ID	symbol	confidence level ^a	(-) under, (+) over ^b	fold change ^c
P31749	207	AKT1	3	-	2.68	O60508	51362	CDC40	2	+	1.99
P07355	302	ANXA2	3	+	2.92	P54105	1207	CLNS1A	3	+	2.41
O43747	164	AP1G1	3	+	5.72	P21964	1312	COMT	2	+	2.71
P63010	163	AP2B1	3	+	2.40	P67870	1460	CSNK2B	3	+	1.90
Q96CW1	1173	AP2M1	2	+	1.93	P78352	1742	DLG4	2	+	4.08
Q9Y2T2	26985	AP3M1	2	+	1.89	Q95GK7	1837	DTNA	3	-	2.42
P05089	383	ARG1	2	+	2.08	P55010	1983	EIF5	3	+	2.19
P52566	397	ARHGDIIB	3	+	2.02	Q08495	2039	EPB49	3	+	2.66
O15145	10094	ARPC3	2	-	2.25	P37268	2222	FDFT1	2	+	5.68
P49407	408	ARRB1	3	-	2.33	P09038	2247	FGF2	2	+	2.69
Q07812	581	BAX	3	+	2.03	P62962	2280	FKBP1A	2	+	1.89
P55212	839	CASP6	3	-	1.95	O75146	9026	HIP1R	2	-	2.08
Q14790	841	CASP8	2	+	2.18	Q9NZL4	23640	HSPBP1	3	+	3.46
Q03135	857	CAV1	2	+	2.07	P05412	3725	JUN	2	+	2.15
P12830	999	CDH1	3	-	2.33	P52292	3838	KPNA2	3	-	7.28
P19022	1000	CDH2	3	+	4.57	P36507	5605	MAP2K2	3	-	2.35
Q53SH4	1134	CHRNA1	3	-	3.11	Q16539	1432	MAPK14	3	-	3.29
P21964	1312	COMT	2	+	2.96	P22033	4594	MUT	3	+	2.46
P00450	1356	CP	3	+	2.36	P54920	8775	NAPA	2	-	1.97
P21291	1465	CSRP1	3	+	2.23	Q8IZ57	140767	NRSN1	3	+	1.93
P49711	10664	CTCF	3	+	6.13	Q16620	4915	NTRK2	3	+	2.50
P25685	3337	DNAJB1	3	-	2.16	P07237	5034	P4HB	3	+	2.04
P63241	1984	EIF5A	3	+	1.94	Q08209	5530	PPP3CA	3	+	7.55
P42566	2060	EP515	3	+	4.28	Q06124	5781	PTPN11	2	+	2.33
Q92889	2072	ERCC4	3	+	5.43	Q99638	5883	RAD9A	2	-	1.97
O75899	9568	GABBR2	3	+	3.39	P43487	5902	RANBP1	3	+	2.29
O43719	27336	HTATSF1	3	+	5.76	Q9UPX8	22941	SHANK2	3	-	1.94
P06756	3685	ITGAV	3	+	6.32	P29353	6464	SHC1	3	+	3.27
Q14974	3837	KPNB1	3	-	1.86	Q92186	8128	ST8SIA2	3	+	4.06
Q16539	1432	MAPK14	3	-	2.81	P31948	10963	STIP1	3	-	1.99
Q9UPY8	22924	MAPRE3	3	+	2.46	O75558	8676	STX11	2	+	2.04
P49736	4171	MCM2	3	+	1.87	P23193	6917	TCEA1	3	-	2.17
P62166	23413	NCS1	3	-	2.24	P07101	7054	TH	2	+	2.78
Q8IZ57	140767	NRSN1	3	+	1.89	P13693	7178	TPT1	3	-	1.93
Q16620	4915	NTRK2	3	+	2.40	Q15628	8717	TRADD	3	-	2.00
Q14980	4926	NUMA1	3	-	1.94	P50607	7275	TUB	3	+	1.91
P07237	5034	P4HB	3	+	2.27	altered protein levels in PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTGvsCoreTG					
Q92878	10111	RAD50	3	+	4.93	protein	gene ID	symbol	confidence level ^a	(-) under, (+) over ^b	fold change ^c
Q99638	5883	RAD9A	2	-	3.10	P07355	302	ANXA2	3	-	2.96
P20936	5921	RASA1	3	+	1.86	O43747	164	AP1G1	3	-	4.20
Q96SB4	6732	SRPK1	3	+	3.11	P63010	163	AP2B1	3	-	3.01
Q92186	8128	ST8SIA2	3	+	5.11	Q96CW1	1173	AP2M1	2	-	1.88
P42224	6772	STAT1	3	+	2.00	Q9Y2T2	26985	AP3M1	3	+	2.38
P40763	6774	STAT3	3	+	2.30	O00499	274	BIN1	2	-	1.88
Q9UNK0	9482	STX8	3	+	1.88	Q9UQM7	815	CAM2KA	3	+	2.06
Q12800	7024	TFCP2	3	+	5.04	Q8N5S9	84254	CAMKK1	2	+	5.78
Q92752	7143	TNR	3	+	5.36	P19022	1000	CDH2	3	-	3.85
Q13263	10155	TRIM28	3	+	4.70	P25108	1134	CHRNA1	3	+	2.55
O43396	9352	TXNL1	3	-	4.82	P49674	1454	CSNK1E	3	+	1.97
P50552	7408	VASP	2	-	2.61	P67870	1460	CSNK2B	3	+	1.88
Q96AJ9	143187	VTI1A	3	+	3.25	P21291	1465	CSRP1	3	+	1.87
Q14191	7486	WRN	3	+	17.12	P49711	10664	CTCF	3	-	5.43
altered protein levels in PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTGvsWT						Q8WTW3	9382	COG1	3	-	7.02
protein	gene ID	symbol	confidence level ^a	(-) under, (+) over ^b	fold change ^c	P00450	1356	CP	3	-	3.55
O15145	10094	ARPC3	2	-	1.96	Q13618	8452	CUL3	3	+	1.91
P49407	408	ARRB1	3	-	2.17	P78352	1742	DLG4	2	+	2.13
P55212	839	CASP6	3	-	2.04	Q9Y4J8	1837	DTNA	3	-	2.94

Table 1. continued

altered protein levels in PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTGvsCoreTG						altered protein levels in PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTGvsCoreTG					
protein	gene ID	symbol	confidence level ^a	(-) under, (+) over ^b	fold change ^c	protein	gene ID	symbol	confidence level ^a	(-) under, (+) over ^b	fold change ^c
Q08495	2039	EBP49	3	+	2.30	Q92878	10111	RAD50	3	-	5.19
O14682	8507	ENC1	3	+	2.88	P20936	5921	RASA1	3	+	2.50
P42566	2060	EPS15	3	-	2.11	P06400	5925	RB1	3	+	2.50
Q92889	2072	ERCC4	3	-	3.49	Q92854	10507	SEMA4D	2	+	2.00
P09038	2247	FGF2	2	-	2.18	Q92529	53358	SHC3	3	-	1.90
P62962	2280	FKBP1A	2	+	2.59	P63208	6500	SKP1	3	-	2.45
P49356	2342	FNTB	2	+	1.95	P43004	6506	SLC1A2	2	+	2.27
O75899	9568	GABBR2	3	-	2.53	Q4U2R8	9356	SLC22A6	3	-	2.23
O75146	9026	HIP1R	3	-	1.97	P42224	6772	STAT1	3	-	1.90
Q9NZL4	23640	HSPBP1	3	+	3.60	P31948	10963	STIP1	3	-	1.98
P61604	3336	HSPE1	3	-	2.17	O75558	8676	STX11	2	+	3.52
Q99730	27336	HTATSF1	3	-	9.24	Q8IZU3	50511	SYCP3	3	+	1.88
Q9Y6K9	8517	IKBKKG	2	+	1.97	P07101	7054	TH	2	+	2.62
P52292	3838	KPNA2	3	-	3.94	Q92752	7143	TNR	3	-	4.62
P36507	5605	MAP2K2	3	-	2.66	O43396	9352	TXNL1	2	+	3.05
Q13505	4580	MTX1	3	-	1.90	P13693	7178	TPT1	3	-	2.85
P62166	23413	NCS1	3	+	2.56	Q13263	10155	TRIM28	3	-	3.53
Q14980	4926	NUMA1	2	+	1.87	Q15628	8717	TRADD	3	-	2.98
P41236	5504	PPP1R2	3	-	2.25	P50607	7275	TUB	3	+	1.96
Q08209	5530	PPP3CA	3	+	12.94	P41542	8615	USO1	3	-	2.05
P13861	5576	PRKAR2A	3	-	1.88	Q14191	7486	WRN	3	-	3.44
Q15276	9135	RABEP1	2	-	2.74						

^aDefined as follows: Level 3 = changes greater than 2-fold from good quality signals that also pass a visual inspection. Level 2 = changes greater than 2-fold from good quality signals that do not pass a visual inspection. ^b+ indicates an increase in protein level in the experimental sample relative to control. - indicates a decrease in protein level in the experimental sample relative to control. ^cA semiquantitative value that represents the general trend of protein changes for the experimental sample relative to control.

by performing the hypergeometric test within TargetMine.¹⁶ The inferred *p*-values were further adjusted for multiple test correction to control the false discovery rate using the Benjamini and Hochberg procedure,^{26,27} and the annotations/pathways were considered significant if *p* ≤ 0.05.

Transcription Factor-Target Associations

Transcription factor (TF)-target associations for the differentially expressed proteins were retrieved from the TF-target repository compiled from Amadeus²⁸ and ORegAnno²⁹ in TargetMine¹⁶ and are discussed in the Supporting Information.

RNAi and Transfection

The siRNA pair targets to VT11A, STX8, and COMT were purchased from Ambion (Ambion, Austin, TX, USA). Stealth RNAi Negative Control Low GC Duplex (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used as a control siRNA. Each siRNA duplex was introduced into the cell lines by using lipofectamine RNAiMax (Invitrogen). Ambion ID numbers of siRNA duplex of VT11A and STX8 were S225671 and S18183, respectively. The replicon cell line, as will be described below, was transfected with each siRNA at a final concentration of 20 nM as per the manufacturer's protocol and then seeded at 2.5×10^4 cells per well of a 24-well plate. The transfected cells were harvested at 72 h post-transfection. The Huh7OK1 cell line, as will be described below, was transfected with each siRNA at a final concentration of 20 nM as per the manufacturer's protocol and then seeded at 2.5×10^4 cells per well of a 24-well plate. The transfected cells were infected with JFH1 at an MOI of 0.05 at 24 h post-transfection. The resulting cells were harvested at the indicated time.

Quantitative Reverse-Transcription PCR (qRT-PCR)

Total RNA was prepared from the cell and culture supernatant using the RNeasy mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN), respectively. First-strand cDNA was synthesized using a high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) with random primers. Each cDNA was estimated by Platinum SYBR Green qPCR Super Mix UDG (Invitrogen) as per the manufacturer's protocol. Fluorescent signals of SYBR Green were analyzed with ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). The HCV internal ribosomal entry site (IRES) region and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene were amplified with the primer pairs 5'-GAGTGTCTCGTCAGCCTCCA-3' and 5'-CACTCGCAAG-CACCCATATCA-3', and 5'-GAAGGTCGGAGTCAACG-GATT-3' and 5'-TGATGACAAGCTTCCCGTTCTC-3', respectively.³⁰ The quantities of the HCV genome and the other host mRNAs were normalized with that of GAPDH mRNA. VT11A and STX8 genes were amplified using the primer pairs 5'-TGACAGGGATGTTGCGAAGA-3' and 5'-CAACCCACATGCAACAGGA-3', and 5'-TTGAAGGG-GACCGAAGACAGAACCCTC-3', and 5'-TCAAAAACCCAA-GCCTCTGGTCTCCT-3', respectively.

Cell Lines and Virus Infection

Cells from the Huh7OK1 cell line are highly permissive to HCV JFH1 strain (genotype 2a) infection compared to Huh 7.5.1 and exhibit the highest propagation efficiency for JFH1.³⁰ These cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere and 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma, St. Louis, MO, USA) supplemented with nonessential amino acids (NEAA), sodium pyruvate, and

10% fetal calf serum (FCS). The human hepatoma cell line Huh7, harboring the full genome of the HCV Con1 strain (genotype 1b), was prepared as described by Pietschmann et al.³¹ We also established an Huh7 cell line harboring the subgenome of the JFH1 strain by the transfection of the plasmid pSGR-JFH1.³² The Huh7-derived cell lines harboring a full length HCV replicon were maintained in DMEM containing 10% FCS, nonessential amino acids, sodium pyruvate, and 1 mg/mL G418 (Nakarai Tesque, Tokyo, Japan). The viral RNA of JFH1 was introduced into Huh7OK1 as described by Wakita et al.³³ The viral RNA of JFH1 derived from the plasmid pJFH1 was prepared as described by Wakita et al.³³

Statistical Analysis

Experiments for RNAi transfection and qRT-PCR were performed three times. The estimated values were represented as the mean \pm standard deviation ($n = 3$). The significance of differences in the means was determined by the Student's *t* test.

RESULTS AND DISCUSSION

Core Expression and PA28 γ Knockout Induce Substantial Changes in the Expression Levels of Host Proteins Associated with HCV Infection in the Liver

The PowerBlot immunoblots showed proteins with increased or decreased levels (defined as those that displayed >1.8-fold change in abundance) in the transgenic samples relative to the WT samples and also relative to each other. In all, we identified 37 proteins with increased levels and 15 proteins with decreased levels in CoreTGvsWT, 24 proteins with increased levels and 15 proteins with decreased levels in PA28 γ ^{-/-}-CoreTGvsWT, and 26 proteins with increased levels and 36 proteins with decreased levels in PA28 γ ^{-/-}-CoreTGvsCoreTG. While most proteins with altered abundance display changes between 1.8-fold and 6-fold, some proteins displayed much higher fold changes. For instance, WRN protein levels increased 17-fold in CoreTGvsWT (Table 1).

Our analysis detected changes in the abundance of proteins, known to be associated with HCV pathogenesis, in the liver samples from CoreTG compared with WT. These include Arginase I (ARG1; +2.08-fold), a liver enzyme associated with the polyamine metabolism, which is known to be overexpressed in HCV-mediated hepatocarcinogenesis;³⁴ STAT3 (+2.30-fold), which is directly activated by the Core and HCV-mediated oxidative stress facilitating tumorigenesis and is also essential for HCV replication;³⁵⁻³⁷ STAT1 (+2-fold), which interacts with Core and facilitates the HCV-mediated attenuation of the host interferon signaling;³⁸ and MAPK14 (p38 MAPK; -2.81-fold), which is cooperatively activated by Core and ethanol in HCV infection³⁹ (Table 1). These results are in line with the previous observations that Core expression can induce HCV pathogenesis and hepatocarcinogenesis in transgenic mice.² Among other examples, BIN1, which interacts with the HCV NSSA protein and contributes to the pathogenesis of HCC,⁴⁰ was suppressed 1.88-fold in PA28 γ ^{-/-}-CoreTGvsCoreTG; this is consistent with the lack of HCC pathogenesis in PA28 γ ^{-/-}-CoreTG mice. Similar studies have aimed to characterize the global changes in the host transcriptome and proteome in response to HCV infection.⁴¹⁻⁴⁴ These studies, however, have not provided specific insights into PA28 γ 's roles in HCV pathogenesis. Our observations suggest that the PowerBlot assay was able to

capture successfully some of the molecular signatures associated with the Core-PA28 γ interplay in HCV pathogenesis.

Topological Analysis of the Extended Protein Interaction Networks

To further understand the biological significance of the differential protein levels, we retrieved PPIs for the proteins with increased and decreased levels in CoreTGvsWT, PA28 γ ^{-/-}-CoreTGvsWT, and PA28 γ ^{-/-}-CoreTGvsCoreTG and inferred the corresponding extended protein interaction networks for each data set using TargetMine (see Materials and Methods). First, we computed the *node degree distribution* and *characteristic/average path length* measures to capture the topology of the extended PPI networks as described earlier.²² The degree of a protein, which corresponds to the number of its interacting partners, may often reflect its biological relevance since a better connected protein may have a higher ability of influencing biological networks via PPIs. Average path lengths provide an approximate measure of the relative ease and speed of transfer of information between the proteins in a network. The CoreTGvsWT extended network was made up of 1373 entities (proteins) with 12535 interactions, the PA28 γ ^{-/-}-CoreTGvsWT extended network of 1057 entities with 8988 interactions, and the PA28 γ ^{-/-}-CoreTGvsCoreTG of 1476 entities with 12871 interactions between them, respectively (Tables S3, S4). For comparison, we also derived an extended PPI network for all the non-genetic PPIs in the human genome as compiled in BioGRID and iRefindex repositories (data not shown). The average degree (defined as the number of interactions for a given protein) of the CoreTGvsWT (17.31), PA28 γ ^{-/-}-CoreTGvsWT (16.1), and PA28 γ ^{-/-}-CoreTGvsCoreTG (16.57) extended networks was higher than the degree inferred for the human interactome (10.17). This observation suggests that HCV infection targets several highly connected cellular proteins with an ability to influence a large number of host factors in HCV pathogenesis. The average (shortest) path lengths of the three extended networks (2.93, 2.9, and 2.97, respectively) were significantly shorter than that inferred for the human interactome (3.88), suggesting that the Core and PA28 γ influenced cellular networks are more compact and inclined toward faster communication between the constituents relative to the human interactome (Figure 1). Our observations are consistent with previous studies on the protein interaction networks associated with HCV infection.^{22,45}

The compactness of the HCV-influenced protein networks coupled with the ability to influence a wide array of factors in the host cellular networks may facilitate a rapid propagation of the signaling information and allow the virus to respond rapidly to the host mobilization against HCV infection.

Functional Analysis of the Extended Protein Interaction Networks

Next, we investigated the extended networks for the enrichment of specific biological associations (KEGG pathways, GO terms, and OMIM phenotypes, Tables S5, S6, and S7). The analysis of the CoreTGvsWT, PA28 γ ^{-/-}-CoreTGvsWT, and PA28 γ ^{-/-}-CoreTGvsCoreTG extended networks revealed an enrichment ($p \leq 0.05$) of 116, 104, and 118 KEGG pathways, respectively (Table S5). Below we describe our observations on the selected enriched biological themes of interest, chiefly associated with the PA28 γ ^{-/-}-CoreTGvsCoreTG network. Functional associations for the host factors previously known to be associated with HCV pathogenesis and HCC are

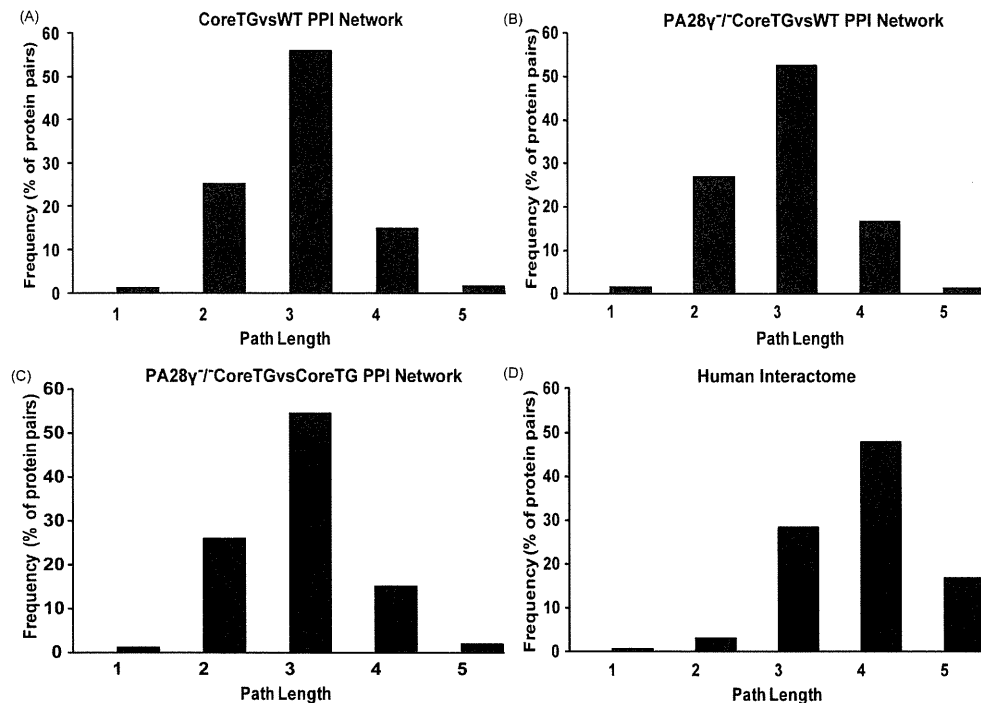


Figure 1. Graphical representation of the shortest path length distribution for (A) CoreTGvsWT extended network, (B) PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTGvsWT extended network, (C) PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTGvsCoreTG extended network, and (D) human interactome. The path length is represented on the *x*-axis, while the *y*-axis describes the frequency, i.e., the percentage of node (protein) pairs within the PPI network with a given shortest path length. For simplicity, only the node frequencies for path lengths 1–5 are displayed.

summarized in Table 2. Specific functional associations for the CoreTGvsWT and PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTGvsWT networks, except when discussed below, are detailed in the Supporting Information. It will highlight the biological significance of the differentially expressed proteins, their interactions, and their probable roles in HCV infection and help identify potentially novel regulators of and biomarkers for HCV pathogenesis.

Vesicular Transport

HCV infection involves the formation of the HCV replication complex in the detergent-resistant membrane (DRM) fraction or lipid rafts. These subcellular membrane fractions are utilized by some pathogens including viruses to facilitate viral entry and assembly.^{46–49} HCV infection induces modifications in the host lipid raft proteome, which directly impacts HCV replication in the infected cells.⁵⁰ Core targeting to the early and late endosomes and the viral particle production requires the components of the endosome-based secretory pathways.^{51,52}

CoreTGvsWT Extended Network. The PowerBlot analysis revealed the two endosomal proteins VTI1A and STX8 (KEGG Pathway “SNARE interactions in vesicular transport”; $p = 0.023$; Table S5) that were upregulated 3.25- and 1.88-fold, respectively, in CoreTGvsWT (Table 1). SNAREs are membrane-anchored proteins involved in membrane trafficking.⁵³ Some SNAREs may function in HCV egress by possibly facilitating the fusion of the late endosomes that carry HCV particles with the plasma membrane resulting in their release into the extracellular environment.⁵² VTI1A is a SNARE involved in the vesicular transport from the late endosomes to the trans-Golgi network and forms a SNARE complex with STX16 and VAMP4 (Table S4).^{54,55} STX8 is involved in the protein trafficking from the early to the late endosomes and exocytosis and forms a SNARE complex with STX7, VAMP8,

and VTI1B.^{55,56} A reduction in the expression of STX7, which interacts with both VTI1A and STX8 (Figure 2; Table S4), decreases HCV replication.⁵⁰ Taken together, the increased abundances of VTI1A and STX8 in CoreTGvsWT, but not PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTGvsWT, suggest potentially crucial roles of the two proteins in the HCV life cycle.

PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTGvsCoreTG Extended Network. Syntaxin 11 (STX11), a SNARE, was upregulated 3.52-fold in PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTGvsCoreTG (Table 1) and was mapped to the enriched KEGG Pathway “SNARE interactions in vesicular transport” ($p = 0.003$; Table S5). STX11 associates with the late endosomes and functions in the essential trafficking pathways (such as cytokine secretion) in the immune cells, with enhanced STX11 expression contributing to increased NK-cell mediated cytotoxicity.^{57–61} STX11 binds with the SNARE VTI1B (Figure 3, Table S4) and regulates its participation the Q-SNARE complexes and, thus, the endocytic and exocytic trafficking in the macrophages. Overexpression of STX11 alters the VTI1B binding to STX6 and STX8 and likely reduces the endosomal transport to the cell surface.⁵⁷

USO1, a Golgi-associated peripheral membrane protein, was decreased 2.05-fold in PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTGvsCoreTG (Table 1) and was identified as a significant linking component of the PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTGvsCoreTG SNARE network (Figure 3). USO1 plays an important role in ER to Golgi trafficking and its knockdown leads to the disintegration of the Golgi complex.^{62,63} Decreased USO1 levels in PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTGvsCoreTG may, therefore, significantly impact the endosomal pathways associated with HCV release.

PA28 γ knockdown impairs the production of the infectious HCV particles (but not replication) in the JFH1 (HCV genotype 2a) infected cells, largely due to the deregulation of the E6AP-dependent Core degradation, which contributes to an antiviral response.¹⁴ Our analysis suggests a potentially novel

Table 2. Functional Analysis of the Extended Protein Interaction Networks^a

proteins	data set ^b	KEGG pathways	prior involvement with HCV pathogenesis and HCC	probable associations with Core/PA28 γ functions in HCV pathogenesis
AKT1	I (-)	Insulin signaling pathway ($p = 5.72 \times 10^{-12}$)	reduced levels associated with insulin resistance (IR) in rats; ¹⁰⁵ Akt phosphorylation is suppressed in the CoreTG mice and contributes to IR. ¹²	Core-induced suppression of AKT1 levels may contribute to IR in HCV pathogenesis.
BAX	I (+)	Apoptosis ($p = 1.58 \times 10^{-18}$)	interacts with NSSA; disrupts mitochondrial homeostasis leading to abnormal cytochrome <i>c</i> release and apoptosis in HCV infection. ^{45,90,92,93}	Core-mediated BAX upregulation may induce host cell apoptosis.
CASP8	I (+)	Apoptosis ($p = 1.58 \times 10^{-18}$)	activated in HCV infection. ⁹⁰	Core-mediated CASP8 upregulation may induce host cell apoptosis.
CDH1	I (+)	Adherens junction ($p = 1.45 \times 10^{-20}$)	downregulated in the rat liver during hepatocarcinogenesis ¹⁰⁶	Core-mediated decrease in CDH1 levels may contribute to HCC
COMT	I (+); II (+)	Steroid hormone biosynthesis ($p = 0.002$)	upregulated in the lipid rafts in HCV infection; ⁵⁰ COMT siRNA knockdown decreases HCV replication ¹⁰³	Core-induced activation of COMT may play an important role in HCV entry and replication
CSNK2B	II (+); III (+)	Adherens junction ($p = 1.4 \times 10^{-13}$); tight junction ($p = 4.46 \times 10^{-7}$)	interacts with the HCV NS3 protein; ⁴⁵ regulates NSSA phosphorylation and hence infectious HCV particle production. ⁸⁷	loss of PA28 γ activity may perturb CK2-mediated NSSA phosphorylation leading to decreased viral propagation.
EPS15	I (+); III (-)	Endocytosis ($p = 2.08 \times 10^{-22}$)	elevated in human and mouse HCC; ¹⁰⁷ mediates human enterovirus 71 entry via clathrin-mediated endocytosis, ¹⁰⁸ which also mediates HCV internalization. ¹⁰⁹	elevated EPS15 levels may facilitate HCC; decreased EPS15 levels may contribute to the lack of HCC in the PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTG. May facilitate HCV entry via clathrin-mediated endocytosis.
MCM2	I (+)	Cell cycle ($p = 1.82 \times 10^{-25}$)	increased hepatocyte MCM2 expression linked with fibrosis progression in HCV infection. ¹¹⁰	Core-mediated enhanced MCM2 activity may contribute to fibrosis in HCV pathogenesis.
PTPN11	II (+)	Natural killer cell mediated cytotoxicity ($p = 3.64 \times 10^{-10}$); Jak-STAT signaling pathway ($p = 5.74 \times 10^{-5}$)	functions as a tumor suppressor in HCC and negatively regulates hepatic insulin action. ^{111,112}	increased PTPN11 levels may be associated with the absence of HCC progression in PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTG.
RABEP1	III (-)	Endocytosis ($p = 2.08 \times 10^{-22}$)	interacts with NS3; ⁴⁵ functions in early endocytic events and regulates mast cell activation. ^{113,114}	may possibly function in HCV propagation.
RB1	III (+)	Cell cycle ($p = 4.04 \times 10^{-20}$)	tumour suppressor, downregulated in HCC. ^{115,116}	increased RB1 levels in III consistent with the lack of HCC progression in the PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTG mice.
TRADD	III (-)	Apoptosis ($p = 1.84 \times 10^{-15}$)	forms a complex with Core and TNFR1, implicated in HCV-induced chronic liver disease. ¹¹⁷	decreased TRADD levels may contribute to the lack of IR and liver disease in PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTG

^aHost factors that were previously known to be associated with HCV pathogenesis and HCC and were mapped to various enriched KEGG pathways associated with the CoreTGvsWT, PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTGvsWT, and PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTGvsCoreTG PPI networks. ^bData set I: CoreTGvsWT; Data set II: PA28 $\gamma^{-/-}$ /CoreTGvsWT; Data set III: PA28 $\gamma^{-/-}$ /CoreTGvsCoreTG; +: upregulated; -: downregulated.