エピジェネティック因子 HP1 γ を介した心筋およびペースメーカー細胞新規誘導法の開発

森川久未 池田信人 池内 悠 白吉安昭
久留一郎*

細胞移植による徐脈性不整脈の再生医療においては、移植する細胞数の確保が大きな課題である。しかしながら、幹細胞からのペースメーカー細胞など心筋細胞の分化効率は極めて低く、より効率的な心筋分化誘導系の確立が急務である。そこで本研究では、心筋分化を促進する因子としてエピジェネティック制御因子 Heterochromatin Protein 1 γ (HP1 γ) に着目し、P19細胞(胚性癌腫細胞)を用いて、HP1 γ 強制発現株を樹立した。心筋分化誘導を行ったところ、野生型 P19細胞がまったく分化を示さなかったのに対して、HP1 γ 強制発現細胞では中胚葉細胞への分化促進に加えて、拍動する心筋細胞が効率よく見いだされた。また、RT-PCRや免疫染色、フローサイトメトリーの結果から、心筋細胞、ペースメーカー細胞で発現する各種マーカー遺伝子の発現が認められ、パッチクランプ法による電気生理学的解析では、自動能、各種イオンチャネル電流が検出された。さらに、この心筋細胞は自律神経作動薬に対して応答し、拍動数が増減することもわかった。これらの結果から、HP1 γ によって、効率よく心筋およびペースメーカー細胞を分化誘導できることが判明した。

(心電図, 2011 ; 31 : 408 ~ 416)

I. はじめに

徐脈性不整脈の治療には、通常機械式ペースメーカーの移植が行われている。しかし、身体活動や情動

Keywords ● ペースメーカー細胞
● 心筋分化誘導
● HP1 γ

鳥取大学大学院医学系研究科機能再生医科学専攻遺伝子再生医療学講座再生医療学分野

(〒683-8503 鳥取県米子市西町 86)

*は責任著者を示す(所属は著者に同じ)

に応じた心拍数の調整ができないこと、定期点検とバッテリー交換の必要性、携帯電話をはじめとする電子機器の電磁波による誤作動の可能性があることなどが指摘されている¹⁾。近年、ペースメーカー機能をもった細胞、すなわち生物学的ペースメーカーを作製して、それらを移植する再生医療の開発が進められている^{1), 2)}。生物学的ペースメーカー作製の試みとして、胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)からペースメーカー細胞を分化誘導する方法がある^{3)~5)}。しかし、臨床応用に至るには、移

Enhanced Cardiac Differentiation of P19 Embryonal Carcinoma Cells through HP1 γ Expression
Kumi Morikawa, Nobuhito Ikeda, Yu Ikeuchi, Yasuaki Shirayoshi, Ichiro Hisatome

2011年3月25日 原稿受領 / 2011年6月20日 掲載承認

植する細胞の数・純度、腫瘍形成の有無など問題が山積みしている⁶⁾。特に、移植細胞数の確保のために、多能性幹細胞を効率よく心筋へ分化させる方法の開発が急務となっている^{6), 7)}。

多能性幹細胞の分化はヘテロクロマチン化などクロマチン構造の変化と相関しており、その過程でヒストン修飾の変化を経由した遺伝子発現の抑制あるいは活性化が起こる^{8), 9)}。このようなエピジェネティックな変化をになう分子のひとつにHP1ファミリーがある¹⁰⁾。HP1はヘテロクロマチン構成蛋白質であり、ヒストンH3K9のメチル化修飾を認識して、遺伝子発現の抑制に関与している^{11), 12)}。HP1ファミリーのひとつであるHP1 γ は、遺伝子発現の抑制のみならず、ES細胞の分化過程で遺伝子発現の活性化にも関与し、HP1 γ の変異ES細胞では初期中胚葉マーカーが減少することが知られている¹³⁾。

そこでわれわれは、HP1 γ を遺伝子導入することによって、心筋への分化誘導効率、さらにはペースメーカー細胞の作製効率に対する効果を調べた。また、効果を調べるモデル系としては、P19細胞を使用することにした¹⁴⁾。P19細胞はES細胞などと同様に、未分化性を維持したまま無限に自己増殖できるという多能性幹細胞の特徴を有した細胞である¹⁵⁾。特に、dimethyl sulfoxide (DMSO)添加時に心筋細胞へ分化することや^{16), 17)}、retinoic acid (RA)添加時に神経細胞に分化することなどが知られており¹⁶⁾、古くから、心筋細胞分化の機序解明に用いられてきた細胞である。本研究では、P19細胞にHP1 γ を強制発現させた際の心筋細胞やペースメーカー細胞への分化能、および分化した細胞の電気生理学的特性を検討した。

II. 材料と方法

P19細胞はC3H/He系統マウスの奇形癌腫より樹立された胚性癌腫細胞である。HP1 γ のC末端にHAのエピトープタグを付加した遺伝子をpCAGベクターに組み込み、P19細胞に遺伝子導入すること

によって、HP1 γ の強制発現株を樹立した。なお、対照としてはAB1マウスES細胞を用いた。分化誘導は、P19細胞、HP1 γ 強制発現細胞およびES細胞から胚様体を形成することによって行った。

ウエスタンブロッティング、RT-PCR、免疫染色などの解析は、既報の方法を用いて行った^{5), 18)}。フローサイトメトリーは、FACS Cant II (BD社製)を用いて解析した。

既報のホールセルパッチクランプ法を用いて、HP1 γ 強制発現細胞由来自律拍動細胞の活動電位ならびに膜電流を記録した。実験は37℃で行った。胚様体の培養液[DMEM (Sigma社製)、10%牛胎児血清(CCB社製)]中にcollagenase type II (終濃度175.9 units/ml, Worthington社製)を加えて、37℃で20分間処理した後、顕微鏡下で拍動部位を切り出し、さらにこの取り出した細胞を0.25% trypsin-1 mM EDTA (Wako社製)を用いて37℃で、3分間反応させることにより、単一細胞に分離した。この自律拍動細胞の膜電位ならびにイオン電流特性を検討するために、matrigel (BD社製)でコートされたガラス板上に心筋細胞を移して12時間以降にvoltage-clamp modeおよびcurrent clamp modeでのパッチクランプ法により電気信号を記録した。細胞内液の組成は120 mM DL-aspartic acid, 4.1 mM KCl, 10 mM HEPES, 5 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 5 mM K₂-ATP, 10 mM glucoseであり、KOHでpH 7.3に調整したものを用いた。細胞外液の組成は1.80 mM CaCl₂, 0.2 nM Fe (NO₃)₃·9H₂O, 0.81 mM MgSO₄(無水), 5.37 mM KCl, 44.04 mM NaHCO₃, 109.51 mM NaCl, 0.70 mM NaH₂PO₄(無水), 24.98 mM glucoseであり、pH 7.4に調整したものを用いた。また、活動電位測定では細胞内通電を容易にするため、電極先端に20 mM Amphotericin B (Wako社製)を毛細管現象により充填しperforated patch-clamp modeで記録した。パッチクランプ法により記録された電気信号はamplifier (Axopatch system, Axon Instruments社製)により増幅され、10 kHzのdigitizer (Digidata 1200, Axon

図1 HP1 γ 強制発現株の樹立

HA タグに対する抗体を用いて、HP1 γ 強制発現株のスクリーニングをウエスタンブロッティングによって行った。#2, #3, #4株で強制発現を確認した。β-actinを内部標準として用いた。

WT: 野生型, HP1 γ : HA-HP1 γ 強制発現株

Instruments社製)を通してコンピューターに取り込み、pClamp software (Clampex and Clampfit, Axon Instruments社製)を用いて解析した。Na⁺電流は保持電位 -90 mV から 10 mV までの 300 msec の脱分極パルスを、+70 mV まで与えて記録した。Ca²⁺電流と K⁺電流は保持電位 -50 mV から 10 mV ごとに 300 msec の脱分極パルスを +70 mV まで与えて記録した。

さらに、タイムラプスイメージングシステム (LCV110, Olympus社製)を用いてイソプロテレノール(終濃度 10⁻⁵M, 東京化成社製)、カルバコール(終濃度 10⁻²M, Sigma社製)を用いた際の胚様体の拍動数の変化を測定した。統計処理には分散分析を用い、p<0.05, p<0.001を統計的に有意とした。データは平均±標準誤差(SE)で記した。

Ⅲ. 結 果

1. HP1 γ 強制発現株の樹立

P19細胞においてHP1 γ の機能を調べるために、強制発現株の樹立を試みた。マウスHP1 γ C末端に強制発現確認のためHAタグを付加した融合遺伝子をpCAGベクターに挿入し、強制発現株を3株樹立した(HP1 γ #2, #3, #4株)。それぞれの株について、HP1 γ 融合蛋白質の発現をHAタグに対する抗体によって確認した(図1)。

2. HP1 γ 強制発現細胞の中胚葉への分化促進

樹立した各HP1 γ 強制発現株の分化誘導時における特性を調べるために、胚様体形成法により分化誘導を行った。P19細胞の分化誘導系では、DMSOを添加したときにのみ心筋細胞に分化し、通常の胚様体形成ではほとんど分化能を示さない。事実、本実験に用いたP19細胞株では、分化誘導後拍動する心筋細胞はみられず、未分化細胞が大多数を占めていた。一方、いずれのHP1 γ 強制発現株の胚様体でも、DMSOなどの薬剤を必要とせずに、拍動する心筋細胞が多数観察された。しかし、分化誘導後も少数ではあるが、未分化細胞や外胚葉・内胚葉系細胞へ分化した細胞も認められた(データ未掲載)。

次に、各HP1 γ 強制発現株における拍動を示す胚様体の割合を調べた(図2A)。野生型P19細胞が、拍動する心筋細胞への分化をまったく示さなかったのに対して、各HP1 γ 強制発現株は、分化誘導後6日目から拍動を開始し、8日目にはほぼすべての胚様体で拍動が観察された。これはES細胞における拍動の割合とほぼ同等であった。そこで、実験に用いた3株のうち、拍動する胚様体の割合が最も高かった#3, #4株を以降の解析に用いることにした。

HP1 γ #4細胞の胚様体を経時的に回収し、RT-PCRによって、各種マーカー遺伝子の発現を調べた(図2B)。初期の中胚葉マーカーであるBrachyuryの発現は、分化誘導後3日目に上昇し、その後も発現が続いていた。これは野生型の発現パターンと同様であった。一方、将来心筋が発生する側板中胚葉のマーカーであるGata4やFlk-1, 心筋幹細胞のマーカーであるNkx2.5, Islet1, Tbx5の発現は、HP1 γ #4細胞で増加した。さらに、心房筋・心室筋のマーカーであるMlc2-aやMlc2-v, 血管内皮細胞のマーカーであるCD31やVE-Cadherin (VE-Cad), 平滑筋のマーカーであるSMMHCの発現もHP1 γ #4細胞では上昇していた。以上の結果より、HP1 γ #4細胞は、胚様体を形成するだけで中胚葉、続いて心・血管系へと分化することが判明した。これは、HP1 γ が中胚葉、心・血管系への分化促進因子であること

図2 HP1γ強制発現細胞における中胚葉、心筋細胞への分化促進

A：拍動する胚様体の割合の評価。野生型(WT)，HP1γ強制発現株(HP1γ #2, #3, #4)，ES細胞(ES)の胚様体における拍動する割合(拍動する胚様体数/形成された胚様体数)の変化を示す。グラフの縦軸には拍動する胚様体の割合(%)，横軸には分化誘導後の日数を示す。HP1γ強制発現株のうち、#4株が最も胚様体の拍動する割合が高く、ES細胞とほぼ同等の増加パターンを示した。野生型P19細胞では、拍動がみられない。

B：RT-PCRによる各種マーカーの発現解析。野生型(WT)，HP1γ #4細胞(HP1γ)を用いて、分化誘導後0, 3, 5, 7日目のmRNAを経時的に回収し、RT-PCRによって、各種マーカーの発現変化を解析した。HP1γ #4細胞では中胚葉・心筋細胞の発現が増加し、中胚葉への分化促進が認められた。

を示唆している。

3. HP1γ #4細胞の心筋前駆細胞の割合

HP1γ #4細胞が、高効率に心筋細胞へ分化することが明らかになったので、心筋前駆(幹)細胞の割合を、心・血管系の共通前駆細胞のマーカーであるFlk-1と、心筋幹細胞のマーカーであるPrion蛋白質を指標にフローサイトメトリーを用いて解析した(図3A)。その結果、分化誘導後3日目でFlk-1陽性細胞の数が顕著に増加し、5～7日目でも維持されていることが判明した。また、Prion陽性細胞もHP1γ #4細胞では有意に増加していた(図3B)。このように、HP1γ #4細胞の分化過程において、実際に心・血管系に共通の前駆細胞や、心筋幹細胞への分化が促進されていることが明らかとなった。

4. HP1γ #3, #4細胞から分化誘導した心筋細胞の特性

HP1γ #3, #4細胞から分化誘導した心筋細胞が固有のイオンチャネルを発現しているか否かを、RT-PCRと免疫染色によって確認した。まず、HP1γ #4細胞の胚様体から拍動部位を切り出し、RT-PCR

図3 HP1γ強制発現細胞における心筋前駆細胞への分化促進

A：フローサイトメトリーによるFlk-1陽性細胞の解析。野生型(WT)，HP1γ #4細胞(HP1γ)を分化誘導後3, 5, 7日目に回収し、Flk-1陽性細胞の割合をフローサイトメトリーで測定した。グラフの縦軸はFlk-1陽性細胞の割合(%)をあらわす。HP1γ #4細胞では、Flk-1陽性細胞の割合が3倍から、最大8.5倍程度にまで増加した。

B：フローサイトメトリーによるPrion陽性細胞の解析。野生型(WT)，HP1γ #4細胞(HP1γ)を分化誘導後7日目に回収しPrion陽性細胞の割合をフローサイトメトリーで測定した。グラフの縦軸はPrion陽性細胞の割合(%)をあらわす。HP1γ #4細胞では、Prion陽性細胞が約2倍程度に増加した。

図4 心筋特異的イオンチャネルの発現確認

- A: RT-PCRによる各種心筋マーカーの発現解析. 野生型(WT), HP1 γ #4細胞(HP1 γ), ES細胞(ES)の心筋特異的マーカーの発現を示す. HP1 γ #4細胞ならびにES細胞では, 心筋分化誘導後9日目に拍動部位を切り出し, RT-PCRのサンプルとした. HP1 γ #4細胞はES細胞と同等の発現パターンを示し, 各種イオンチャネルの発現を有することが明らかとなった.
- B: 免疫染色による心筋特異的マーカーの発現解析. HP1 γ #3, #4株の心筋分化誘導後12, 13, 14日目の拍動部位を切り出し, 免疫染色を行った結果を示す. 核はDAPIで染色した. HP1 γ #3, #4細胞では, 心筋特異的収縮蛋白質やイオンチャネル蛋白質の発現が確認された.

によって心筋特異的転写因子であるTbx5, 心房筋・心室筋のマーカーであるMlc2-a, Mlc2-v, ペースメーカ細胞のマーカーであるShox2, HCN4, Cav3.1, Cav3.2, 心筋脱分極をになうチャネルであるCav1.2, Nav1.5, 心筋再分極をになうチャネルであるKir2.1, Erg, 心筋特異的ギャップ結合蛋白質であるCx40, Cx43の発現を調べた(図4A). その結果, いずれのマーカー遺伝子の発現も, ES細胞の胚様体由来する心筋拍動部位と同等の発現パターンを示した. これは, HP1 γ #4細胞から生じる心筋細胞の遺伝子発現が, ES細胞由来のパター

ンと同等であるため, 成熟した心筋細胞, ペースメーカ細胞が分化していることを意味している.

さらに, 免疫染色によって, 心筋マーカー蛋白質の発現を調べた(図4B). その結果, RT-PCRによる解析と同様に, HP1 γ #3, #4細胞から生じた心筋細胞では, tropomyosin Cや, cardiac troponin T (cTnT)といった心筋細胞特異的収縮蛋白のみならず, Kir2.1やHCN4, Cx43といった心筋細胞, ペースメーカ細胞特異的イオンチャネル, ギャップ結合蛋白質の発現も確認した. 同時に, 遺伝子導入したHP1 γ のC末端に付加してあるHAタグの発現も,

図5
ペースメーカー細胞特異的な電気生理学的特性の検出

HP1 γ #3, #4細胞について、心筋分化誘導後12, 13, 14日目に拍動部位を切り出し、酵素処理した単一細胞より、自発活動電位(A)をcurrent clamp modeで、K⁺, Ca²⁺チャネル電流(B), Na⁺チャネル電流(C)をvoltage clamp modeでパッチクランプ法を用いて検出した。成熟型の自動能や各種イオンチャネル電流が確認でき、HP1 γ #3, #4細胞の分化誘導系でもペースメーカー細胞が分化誘導されていることが示された。

これらの分化した心筋において観察できた。以上の結果より、HP1 γ を強制発現することによって、薬剤処理することなくES細胞を用いた場合と同等の心筋細胞、ペースメーカー細胞を作製できることが示された。

5. HP1 γ #3, #4細胞由来心筋細胞の自動能

HP1 γ #3, #4細胞から誘導された心筋細胞がペースメーカー細胞としての機能を有するか否かを、パッチクランプ法によって解析した(図5)。その結果、最大拡張期電位が-50 mVの成熟型の自動能をもつ細胞が存在した。さらに、この細胞はK⁺チャネル、Ca²⁺チャネル、Na⁺チャネルの活性化による外向きまたは内向き電流も有していた。加えて、この細胞からはペースメーカー電流をになう過分極誘発陽イオン電流(I_f電流)も検出された(データ未掲載)。また、今回解析した細胞のうち、自律拍動する細胞はすべて洞結節型の活動電位を示していた。一方で、自律拍動を示さない心筋細胞は心房筋型の活動電位を示していた。以上の解析から、HP1 γ #3, #4細胞の胚様体のなかには、電気生理学的にも成熟した心筋細胞およびペースメーカー細胞が含まれていることが明らかとなった。

図6 心筋拍動部位の自律神経に対する応答性

HP1 γ #3細胞の心筋拍動部位の拍動数を、タイムラプスイメージングシステムを用いて測定した。グラフの縦軸は1分間の胚様体の拍動数(beating per minute : b.p.m.)、横軸は通常時(対照)、各種薬剤添加後(カルバコール、イソプロテレノール)、薬剤洗浄後(カルバコール薬剤洗浄後、イソプロテレノール薬剤洗浄後)を示す。カルバコール添加時には拍動数が減少し、イソプロテレノール添加時には拍動数が上昇することが測定された。また、薬剤を除去すると拍動数が通常時とほぼ同等数に回復することも示された。

6. HP1 γ #3細胞由来心筋細胞の自律神経に対する応答性

最後に、HP1 γ #3細胞から誘導された心筋細胞が交感神経、副交感神経刺激に生理的に応答する機能を有するか検討した。図6に示すように、ムスカリン受容体刺激薬であるカルバコール添加時には拍動数は3分の2程度に有意に減少したが、カルバコールの除去により、前値まで回復した。一方で、 β 受容体刺激薬であるイソプロテレノールは拍動数を有意に上昇させたが、イソプロテレノールの除去により前値に回復した。以上の結果から、HP1 γ #3細胞から分化誘導した心筋細胞は自律神経への応答性を有していることが判明した。

IV. 考 察

今回の研究では、HP1 γ の強制発現により、P19細胞の中胚葉分化が促進され、心筋細胞が効率的に分化することが明らかになった。これまで、P19細胞を用いた心筋分化誘導系には、DMSO添加による方法とEND-2細胞をフィーダー細胞として用いた誘導法が知られている。心筋細胞の拍動開始時期は、DMSOによる場合が分化誘導後12日目、END-2フィーダー細胞による場合が誘導後8日目であった^{19), 20)}。今回のHP1 γ による心筋分化誘導系では、心筋の拍動開始時期は分化誘導後5日目であり、これまでの報告よりも早く拍動を開始した。加えて、従来の方法では心室筋マーカーであるMlc2-vの発現が分化誘導後8日目以降に観察されるのに対し²¹⁾、HP1 γ 強制発現細胞では分化誘導後3日目から発現していた。これらの結果より、HP1 γ の強制発現によって、通常分化しない培養条件下においても心筋が分化するのみならず、心筋分化そのものが大幅に促進されていることが明らかとなった。

DMSO添加による分化誘導系で得られる心筋細胞では、分化誘導後16～18日目に検出できる自発活動電位の最大拡張期電位が浅く未成熟型のものであること、分化誘導後22～25日になると成熟型に近づくが、依然として最大拡張期電位は -40 mV

と浅く、拍動数も1秒間に2回程度と非常に遅いことが報告されている²¹⁾。一方、HP1 γ を用いた誘導系では、分化誘導されたペースメーカ細胞の最大拡張期電位は -50 mVと深く、十分に成熟した細胞であった。さらに、このペースメーカ細胞は、1秒間に6回と速い拍動リズムをもつことも明らかになっている。以上の結果より、HP1 γ はP19細胞の心筋分化を促進させるとともに、ペースメーカ細胞の成熟化(ペースメーカ細胞の終末分化を)をも促す可能性が示唆された。また、HP1 γ により分化誘導されたペースメーカ細胞は、拍動数もマウスの心臓の拍動数と同等であり、さらに胚様体の心筋細胞は自律神経刺激に対する応答性も認められた。このため、今回誘導されたペースメーカ細胞は機能的にも成熟している可能性が高い。HP1 γ の遺伝子導入による心筋分化誘導は、分化のみならずペースメーカ細胞の成熟化も促進し、生物学的ペースメーカの効率のよい作製法となる可能性がある。また、われわれは、HP1 γ をES細胞に強制発現させた際にも、心筋分化が同様に促進されることを明らかにしている(データ未掲載)。以上より、HP1 γ は多くの多能性幹細胞に対し心筋へ分化誘導するための因子として共通にはたらくことが示唆される。

HP1 γ による心筋分化については、中胚葉分化が促進され、その結果として、中胚葉に由来する心筋が増加する可能性と、より直接的に心筋分化に寄与している可能性が考えられる。中胚葉マーカーBrachyuryの発現は、野生型とほぼ同等であるのに対して、Flk-1陽性の心・血管共通前駆細胞数が上昇していることから、HP1 γ は心筋分化に直接的に作用していることが推測される。これは、HP1 γ 強制発現細胞において、DMSOやEND-2フィーダー細胞を用いた心筋分化誘導よりも、早期にMlc2-a, Mlc2-vなどの心房筋・心室筋マーカーが検出されることから示唆される。さらに、誘導される心筋細胞やペースメーカ細胞も、HP1 γ 強制発現細胞ではより成熟型のため、分化のみならず細胞の成熟化にも寄与している可能性がある。これらより、HP1 γ

は心筋分化の早期および後期の両方において関与しているのではないかと考えられる。

DMSO添加がP19細胞の分化誘導系において心筋分化を促進する機序については、BMPシグナルと、その下流のMAPKKKシグナルやSmadシグナル、さらにはnon-canonical Wntシグナルなどの関与が報告されている。これらのシグナル系を經由して、心筋分化に必須である転写因子Gata-4, Mef2c, Nkx2.5, Tbx5の発現が活性化され、心筋分化が促進されと考えられている²²⁾。さらに、この誘導には胚様体形成による細胞の凝集も必須であり、細胞間接着シグナルの重要性も示唆されている²²⁾。一方、今回の研究で着目したHP1 γ はヘテロクロマチン構成蛋白質であり、DMSOのような薬剤とは異なり、直接遺伝子の発現を制御するエピジェネティック因子である。まだ具体的な遺伝子発現の制御機序については情報が少なく不明な点も多いが、クロマチン構造を変化させることによって心筋分化関連遺伝子の発現が起こる可能性と、HP1 γ への結合が報告されている転写因子TIF1 β などによって²³⁾直接的に心筋分化関連遺伝子の発現が誘導される可能性などが考えられる。

V. おわりに

HP1 γ 強制発現細胞の分化誘導系には心筋細胞が含まれているが、それ以外に未分化細胞や外胚葉系および内胚葉系の細胞も含まれている。そのため、心筋細胞の選択的分取法を開発する必要がある。今回の方法のように、遺伝子の強制発現による分化効率の上昇を、実際の再生医療へ応用することは難しい。しかし、今後発生過程におけるHP1 γ の作用機序を明らかにし、関与するシグナル因子を明らかにできれば、あるいはHP1 γ と同等の作用を示す化合物などをスクリーニングによって特定できれば、より安全に効率よく心筋細胞やペースメーカー細胞を調整することが可能になり、徐脈性不整脈の再生医療の実現につながると考えられる。

【文 献】

- 1) 本莊晴朗, 李 鍾国, 神谷香一郎, 児玉逸雄: 徐脈性不整脈に対する遺伝子・細胞治療の展望. Medical Topics Series不整脈2007: (杉本恒明, 井上 博), 1版. メディカルレビュー社, 大阪, 2007; 43~54
- 2) Rosen MR, Brink PR, Cohen IS, Robinson RB: Genes, stem cells and biological pacemakers. Cardiovasc Res, 2004; 64: 12~23
- 3) Kehat I, Khimovich L, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G, Huber I, Satin J, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L: Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. Nat Biotechnol, 2004; 22: 1282~1289
- 4) Xue T, Cho HC, Akar FG, Tsang SY, Jones SP, Marbán E, Tomaselli GF, Li RA: Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient ventricular cardiomyocytes: insights into the development of cell-based pacemakers. Circulation, 2005; 111: 11~20
- 5) Morikawa K, Bahrudin U, Miake J, Igawa O, Kurata Y, Nakayama Y, Shirayoshi Y, Hisatome I: Identification, isolation and characterization of HCN4-positive pacemaking cells derived from murine embryonic stem cells during cardiac differentiation. Pacing Clin Electrophysiol, 2010; 33: 290~303
- 6) Yoshida Y, Yamanaka S: Recent stem cell advances: induced pluripotent stem cells for disease modeling and stem cell-based regeneration. Circulation, 2010; 122: 80~87
- 7) Yamashita JK, Takano M, Hiraoka-Kanie M, Shimazu C, Peishi Y, Yanagi K, Nakano A, Inoue E, Kita F, Nishikawa S: Prospective identification of cardiac progenitors by a novel single cell-based cardiomyocyte induction. FASEB J, 2005; 19: 1534~1536
- 8) Li B, Carey M, Workman JL: The role of chromatin during transcription. Cell, 2007; 128: 707~719
- 9) Surani MA, Hayashi K, Hajkova P: Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. Cell, 2007; 128: 747~762
- 10) Lomberk G, Wallrath L, Urrutia R: The Heterochromatin Protein 1 family. Genome Biol, 2006; 7: 228
- 11) Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T: Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. Nature, 2001; 410: 116~120
- 12) Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T: Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by

- the HP1 chromo domain. *Nature*, 2001 ; 410 : 120 ~ 124
- 13) Naruse C, Fukusumi Y, Kakiuchi D, Asano M : A novel gene trapping for identifying genes expressed under the control of specific transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007 ; 361 : 109 ~ 115
 - 14) McBurney MW, Rogers BJ : Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. *Dev Biol*, 1982 ; 89 : 503 ~ 508
 - 15) McBurney MW : P19 embryonal carcinoma cells. *Int J Dev Biol*, 1993 ; 37 : 135 ~ 140
 - 16) Jones-Villeneuve EM, McBurney MW, Rogers KA, Kalnins VI : Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J Cell Biol*, 1982 ; 94 : 253 ~ 262
 - 17) Edwards MK, Harris JF, McBurney MW : Induced muscle differentiation in an embryonal carcinoma cell line. *Mol Cell Biol*, 1983 ; 3 : 2280 ~ 2286
 - 18) Kawazoe S, Ikeda N, Miki K, Shibuya M, Morikawa K, Nakano S, Oshimura M, Hisatome I, Shirayoshi Y : Extrinsic factors derived from mouse embryonal carcinoma cell lines maintain pluripotency of mouse embryonic stem cells through a novel signal pathway. *Dev Growth Differ*, 2009 ; 51 : 81 ~ 93
 - 19) Mummery CL, van Achterberg TA, van den Eijnden-van Raaij AJ, van Haaster L, Willemse A, de Laat SW, Piersma AH : Visceral-endoderm-like cell lines induce differentiation of murine P19 embryonal carcinoma cells. *Differentiation*, 1991 ; 46 : 51 ~ 60
 - 20) Moore JC, Spijker R, Martens AC, de Boer T, Rook MB, van der Heyden MA, Tertoolen LG, Mummery CL : A P19Cl6 GFP reporter line to quantify cardiomyocyte differentiation of stem cells. *Int J Dev Biol*, 2004 ; 48 : 47 ~ 55
 - 21) van der Heyden MA, van Kempen MJ, Tsuji Y, Rook MB, Jongsma HJ, Ophhof T : P19 embryonal carcinoma cells : a suitable model system for cardiac electrophysiological differentiation at the molecular and functional level. *Cardiovasc Res*, 2003 ; 58 : 410 ~ 422
 - 22) van der Heyden MA, Defize LH : Twenty one years of P19 cells : what an embryonal carcinoma cell line taught us about cardiomyocyte differentiation. *Cardiovasc Res*, 2003 ; 58 : 292 ~ 302
 - 23) Kwon SH, Workman JL : The changing faces of HP1 : From heterochromatin formation and gene silencing to euchromatic gene expression : HP1 acts as a positive regulator of transcription. *Bioessays*, 2011 ; 33 : 280 ~ 289

Enhanced Cardiac Differentiation of P19 Embryonal Carcinoma Cells through HP1 γ Expression

Kumi Morikawa, Nobuhito Ikeda, Yu Ikeuchi, Yasuaki Shirayoshi, Ichiro Hisatome

Institute of Regenerative Medicine and Biofunction, Graduate School of Medical Sciences, Tottori University Faculty of Medicine

In the currently available cardiac differentiation system in pluripotent stem cells, the number of differentiating pacemaker cells is not sufficient to use cell therapy of bradycardia because of their limited efficacy in cardiac differentiation. Therefore, it is important to establish the method of an effective cardiac differentiation system. For this purpose, we studied the role of Heterochromatin protein 1 γ (HP1 γ) in cardiac differentiation. We first established several HP1 γ over-expressing P19 embryonal carcinoma cell lines (HP1 γ -P19). Although wild type-P19 cells did not differentiate into cardiac cells, HP1 γ -P19 cells differentiated into cardiac cells with spontaneous beating after embryoid body (EB) formation, indicating that HP1 γ facilitated cardiac differentiation. RT-PCR analysis revealed that HP1 γ -P19 EBs expressed various cardiac differentiation marker genes. Immunostaining showed that the beating cardiomyocytes derived from HP1 γ -P19 cells expressed cardiac contractile proteins, cardiac ion channel proteins and cardiac specific gap junction proteins. Flow cytometer analysis showed that EBs derived from HP1 γ -P19 cells involved the higher prevalence of cardiac stem cells expressing Flk-1 and prion protein. Electrophysiological study indicated that the differentiated cells from HP1 γ -P19 cells revealed spontaneous action potential associated with cardiac-specific K⁺ channel currents, Ca²⁺ channel currents and Na⁺ channel currents. Cardiomyocytes derived from HP1 γ -P19 cells were able to respond to autonomous nerve system agonists such as isoproterenol and carbachol. These data suggest that HP1 γ facilitated differentiation of P19 cells into cardiac stem cells and promoted their maturation into cardiac cells involving pacemaker cells.

Keywords : Pacemaker cells, Cardiac differentiation, HP1 γ