マウス胚性幹細胞を用いた心筋細胞 分化機構解明の試み

飯田みどり・平家俊男・吉本桃子・中畑龍俊*

A study for cardiac stem cells from embryonic stem cells using the cell sorting system

Recently, various kinds of tissue specific stem cells, such as hematopoietic stem cells or neural stem cells, have been identified. It has been well known the embryoid body formed by aggregated embryonic stem (ES) cells differentiate into cardiac muscle cells, but cardiac progenitor/stem cells, which are supposed to exist during cardiac differentiation, have not been identified. Here, we intended to characterize cardiac progenitor/stem cells from ES cells using FACS sorting system. We considered that flk 1 might be a good marker for isolating cardiac progenitor/stem cells. Because flk 1 is one of the early markers of the anterior lateral mesoderm where vasculogenesis and also cardiomyogenesis originate from paired regions of the cardiac crescent. Differentiation of ES cells was induced in suspension culture in medium without leukemia inhibitory factor (LIF). At 3.75 day from induction, the cells were stained with anti-flk 1 antibody, and cells with flk 1+ or flk 1- were sorted respectively. Each subpopulation was co-cultured on OP 9 stromal cell. The differentiation of cardiac muscle cells was examined at day 10. Simultaneously, the gene expression analysis for Nkx-2.5 was carried out using RT-PCR.

No colonies of contracting cardiac muscle cells were identified on tissue culture plate or type 4-collagen coated plates. Contracting muscle cells were identified only after plating on OP 9 cells, although no colonies on NIH 3 T 3 cells. These results suggest that OP 9 cells supply a signal indispensable for cardiac cell differentiation. However, there were no significant difference in numbers of contracting colonies and expression of Nkx 2.5 between flk 1+ and flk 1- cells. In this sense, the significance of flk 1 for cardiac cell differentiation still requires further discussion. Further examination remains to be done about signaling molecules for cardiac muscle cell differentiation.

Rec. 10/17/2001, Acc. 1/23/2002, pp145~151

*Midori Iida · Toshio Heike · Momoko Yoshimoto · Tatsutoshi Nakahata**

key words : ES cells, cardiac cells, flk1, OP9, FACS sorting

近年、骨髄細胞、胎仔心筋細胞などを用いた心臓疾患への細胞移植治療が行われるようになり、症状の改善を認めている¹⁻³⁾。このため心臓疾患への心筋細胞移植療法を確立するには、安全な心筋細胞の安定確保が不可欠とされるが、その入手、作製には困難を伴う。脊椎動物の発生過程において心筋前駆細胞は前方側板中胚葉に由来し、心筒、ルーピングを経て、左右心房心室形成に至る。こ

の過程において、Nkx 2.5をはじめとする種々の調節因子が関与することが近年明らかにされ、心筋細胞の分化に関する多くの知見が集積されつつある。しかしまだ、心筋細胞分化の機構に関し、不明の点が多い。

胚性幹細胞(以下 embryonic stem cells : ES 細胞とする)はさまざまな組織に分化できる多分化能を有するため、移植再生医療の礎となることが期待されている。実際、マウス ES 細胞より作製した心筋細胞を用いた移植もすでに報告されている⁴⁾。しかしながら、心筋細胞には血液細胞などの

* Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Kyoto University 京都大学大学院医学研究科発達小児科学講座

図 1 従来の ES 細胞から心筋細胞への分化の方法
 (embryoid body: EB 形成による)

図 2 従来の EB 形成による心筋細胞への分化
 14 日目におけるミオシン蛋白質の発現
 1 次抗体: MF 20 (mouse anti-sarcomeric myosin), 2 次抗体: anti-mouse IgG-FITC
 収縮する重層した複数の細胞が染色された。

ように特異的な細胞表面抗原が同定されておらず, ES 細胞から心筋細胞を特異的に単離する基盤技術の開発が模索されている。

従来, ES 細胞から心筋細胞分化に関する報告の多くは, hanging drop 法から suspension culture を行うことで embryoid body (EB) を形成させ, 分化誘導させる系を使用している (図 1)⁵⁾。しかしこの方法では, 分化後 7 日目には自律拍動する心筋細胞のクラスターを認めるが, 複数の細胞がクラスターとして重層し収縮するため (図 2), 純粋な心筋細胞の解析は難しい。そこで純度の高い単一の心筋細胞のコロニーを得るためにフロー

サイトメトリーによる細胞純化システムの開発が必要となる。

今回筆者らは, 心筋細胞が中胚葉由来であることより, 早期の中胚葉のマーカである vascular endothelial growth factor receptor の一つの flk 1 に注目した⁶⁻⁸⁾。フローサイトメトリーによる分取後の細胞は OP 9 ストロマ細胞と共培養することにより分化を試みた。OP 9 細胞は骨大理石症モデルマウスである *op/op* マウスから樹立されたストロマ細胞で^{9,10)}, ES 細胞より中胚葉細胞への分化を効率よく誘導できる。

筆者らは flk 1 をマーカーとして心筋前駆/幹細胞への純化を試み, さらに OP 9 細胞と共培養を行うことで中胚葉分化を誘導し, flk 1 の心筋細胞分化における意義について検討した。

方 法

(1) ES 細胞

ES 細胞は GACT 4 を用いた。GACT 4 は親株 ES 細胞である EB 5 に強力なプロモーター活性を有する CAG で駆動される, enhanced green fluorescent protein (EGFP) 遺伝子を導入した ES 細胞の cell line である。分化誘導は α -MEM, 10% FCS, 2 ME 組成の培地で suspension culture を行って EB を作製し, 分化後 4 日目に cell dissociation buffer (GIBCO BRL) で細胞を単離し, flk 1 抗体である AVAS 12¹¹⁾ にて染色し, FACS VantageSE (Becton Dickinson 社) を用いて細胞

図3 今回筆者らが行ったフローサイトメトリーを用いた細胞純化システム

を分散した。

図3に示すように flk1 陽性細胞と、陰性細胞に分けて分散し、それぞれ 24 well-plate の 1 well に 2,000 個ずつ、OP 9 細胞と共培養した。分化誘導後 10 日目にそれぞれ心筋細胞分化を評価するために免疫染色、contracting colony 数、RT-PCR およびフローサイトメトリーを用いた検討を行った。

(2) 免疫染色

OP 9 細胞と共培養した flk1 陽性細胞、陰性細胞それぞれの 24 well-plate を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、PBS で洗浄後、2% スキムミルクでブロッキングし、一次抗体に anti-sarcomic myosin (MF 20) を、二次抗体に donkey anti-mouse IgG-ALP を用いてアルカリフォスファターゼ染色を行った。

図 4 分化誘導後 10 日目の 24 well 中の contracting colony 出現 well 数
24 well 中の colony 出現 well 数は+, -で有意差はなかった。

図 5 分化誘導後 10 日目の総 contracting colony 数
24 well 中の contracting colony 数は+, -で有意差はなかった。

(3) RT-PCR

OP 9 細胞と共培養した flk 1 陽性細胞, 陰性細胞それぞれの 24 well-plate の 1 well ずつから trizol reagent (GIBCO BRL) を用いて total RNA を回収し, DNase I 処理後, poly A tail primer oligo(dT)¹²⁻¹⁸ (GIBCO BRL) により逆転写反応を行い, 1 μ g の total RNA から cDNA を精製した。

Nkx 2.5 に特異的なプライマー (5'-GTGGGTCTCAATGCCTATG-3', 5'-CTCTTTCCCTACCAGGCTC-3', 233 bp) を用いて PCR を行い, 発現量の検討を行った。同様に housekeeping gene として GAPDH (5'-GTCGGTGTGAACGGATTTGGCC-3', 5'-TCCAGAGGGGCCATCCACAGTC-3', 564 bp) も行った。

図 6 分化誘導後 10 日目のミオシン蛋白質の発現

1 次抗体: MF 20 (mouse anti-sarcomeric myosin), 2 次抗体: donkey anti-mouse IgG-ALP
stroma 上の contracting colonies が染色された。

図 7 半定量 RT-PCR による Nkx 2.5 の mRNA レベル

Contracting colonies が肉眼的に確認できるのは day 9 以後だが, Nkx 2.5 は day 6 より flk 1+, -群ともに発現している。

PCR はサーマルサイクラーを用いて 94°C30 sec, 60°C30 sec, 72°C60 sec で行った。PCR 反応液を 2% アガロースゲルで電気泳動したあと, エチジウムブロマイドで染色し, 反応生成物をエチジウムブロマイドの蛍光強度としてデンシトグラフィ (ATTO) を用いて測定し, RT-PCR カイネティクス分析法¹²⁾で Nkx 2.5/GAPDH を求めることにより半定量化した。

なお, Nkx 2.5, GAPDH ともに PCR を 25, 30, 35 cycle でそれぞれ行い, 25, 30 cycle が linear phase であることを確認し, 30 cycle での数値か

図 8 分化誘導後 10 日目の CD 45 陽性細胞の評価

マウス PE 標識抗 CD 45 抗体にて染色した. flk 1 陽性細胞群のほうが若干, 陰性群よりも血液細胞の分化が多い結果であった.

ら Nkx 2.5/GAPDH を計算した.

(4) フローサイトメトリー: 血液細胞への分化

OP 9 細胞と共培養した flk 1 陽性細胞, 陰性細胞それぞれの 24 well-plate の 1 well ずつから cell dissociation buffer (GIBCO BRL) で細胞を単離し, マウス PE 標識抗 CD 45 抗体にて染色し, FACS Caliber (Becton Dickinson 社) にて CD 45 陽性血液細胞分化の評価を行なった.

結 果

(1) フローサイトメトリーによる細胞純化

FACS VantageSE (Becton Dickinson 社) を用いて cell sorting 後 flk 1 陽性細胞と, 陰性細胞に分画し, それぞれ 24 well-plate で OP 9 細胞と共培養した. 分化誘導後 10 日目には flk 1 陽性細胞群, 陰性細胞群ともに自律収縮をする心筋細胞のコロニーの出現を認めた. このコロニーは EB を形成させ, 分化誘導を行ったときにみられるような複数の細胞が, クラスターとして重層し収縮するのではなく, 単一な心筋細胞のコロニーを形成することができた.

(2) Contracting colony 数

分化誘導後 10 日目で contracting colony 数をカウントした. 実験を 5 回行い, 24 well 中の colony 出現 well 数をカウントした (図 4). flk 1 陽性群は 24 well 中 22.8 ± 1.64 well で陰性群は 24 well 中 23.2 ± 1.30 well で収縮コロニーを認め,

有意な差は認めなかった.

また, 総 colony 数 (図 5) では 5 回行った実験で flk 1 陽性群は 97 ± 19 , 陰性群で 103 ± 30 で contracting colony 数でも有意な差は認めなかった.

(3) 免疫染色

分化誘導後 10 日目の flk 1 陽性細胞の免疫染色を図 6 示す. contracting colony が myosin にて染色された. sorting system を用いることで 1 個の細胞から心筋細胞のコロニーを分化させることができた. flk 1 陰性群でも同様のコロニーが染色された.

(4) RT-PCR

半定量 RT-PCR により Nkx 2.5 の mRNA レベルを測定した. 分化誘導後 6 日目から flk 1 陽性群, 陰性群ともに Nkx 2.5 の発現がみられたが, デンシトグラフィー (ATTO) を用いて求めた Nkx 2.5/GAPDH で flk 1 陽性群, 陰性群での有意な発現の差は認めなかった (図 7).

(5) 血液細胞への分化

分化誘導後 10 日目に浮遊細胞および付着細胞を回収し, フローサイトメトリーにより抗 CD 45 抗体を用いて分化した血液細胞を評価した. CD 45 陽性細胞は flk 1 陽性細胞群で 13%, 陰性群で 8%, データのばらつきから統計的には明らかではないものの, 血液細胞の分化は flk 1 陽性細胞群が多い傾向であった (図 8).

考 察

ES細胞を用いた心筋細胞分化は、血液細胞、神経細胞分化などと異なり、EBを経て、なんらほかの因子を加えることなく、容易に分化誘導できる。このため、現在までにEBを用いたES細胞由来の心筋細胞分化に関する多数の報告がなされている。このEBは均一な細胞ではなく心筋前駆/幹細胞と心筋分化に関与する間質細胞とにより構成されと考えられる。

しかしながら、神経細胞などですでに報告¹³⁾されているように、このなかから組織幹細胞を分画し、心筋細胞を特異的に分化誘導させる方法は確立されていない。今回、ES細胞から心筋細胞への分化の機構を明らかにするため、その過程に存在する心筋前駆/幹細胞の同定をフローサイトメトリを用いて試みた。心筋細胞は中胚葉組織に属する。

したがって、より早期の心筋前駆細胞を得るために、早期の中胚葉のマーカーとしても知られるflk1をsorting systemのマーカーとして用い、細胞を分画後、心筋細胞への分化能について検討した。分取した細胞をゼラチンコートしたプレートや、type 4-collagenをコートしたプレート上での培養も試みたが、心筋細胞への分化は認めなかった。

ストロマ細胞にOP9を用いて共培養することで、1個の細胞から心筋細胞のコロニーを分化させることができた。また、ほかのストロマ細胞として、NIH 3T3においても分化を試みたが、心筋細胞への分化を認めなかった。このためOP9には、心筋細胞への分化を促進するなんらかの因子が存在することが推測された。今後、このシステムを用いてさらに解析を進めることで、心筋細胞の分化過程の詳細な解析が可能となると思われる。

一方、flk1陽性群、陰性群間でcontracting colony数、RT-PCRなどにおける有意な差はなく、flk1陰性細胞はflk1陽性の過程を経て心筋細胞へ分化していくのか、flk1陰性のまま分化していくのか、それともflk1は心筋前駆/幹細胞の指標とはなり得ないのか、不明である。心筋細胞

分化における細胞系を考察するうえでほかの細胞表面抗原をも含めた検索が必要である。

今回筆者らはOP9細胞を用いることによりsortingした細胞1個より、心筋細胞分化が誘導できる系を作製した。今後、この分化誘導過程に関与するシグナル分子の同定を行い、制御された心筋細胞分化システムの開発を行う予定である。

文 献

- 1) Kocher AA et al.: Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 7(4): 430-436, 2001.
- 2) Etzion S et al.: Influence of embryonic cardiomyocyte transplantation on the progression of heart failure in a rat model of extensive myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 33(7): 1321-1330, 2001.
- 3) Reinecke H et al.: Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. *Circulation* 100(2): 193-202, 1999.
- 4) Klug MG et al.: Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 98(1): 216-224, 1996.
- 5) Hescheler J et al.: Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res* 36(2): 149-162, 1997.
- 6) Nishikawa SI et al.: Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development* 125(9): 1747-1757, 1998.
- 7) Yamashita J et al.: Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408(6808): 92-96, 2000.
- 8) Haruta H, Nagata Y, Todokoro K: Role of Flk-1 in mouse hematopoietic stem cells. *FEBS Lett* 507(1): 45-48, 2001.
- 9) Nakano T, Kodama H, Honjo T: Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 265(5175): 1098-1101, 1994.
- 10) Stanford WL et al.: Expression trapping: identification of novel genes expressed in hematopoietic and endothelial lineages by gene trapping in ES cells. *Blood* 92(12): 4622-4631, 1998.
- 11) Kataoka H et al.: Expressions of PDGF receptor alpha, c-Kit and Flk1 genes clustering in mouse chromosome 5 define distinct subsets of nascent mesodermal cells. *Dev Growth Differ* 39(6): 729-740, 1997.
- 12) Yokoi H et al.: Non-radioisotopic quantitative

RT-PCR to detect changes in mRNA levels during early mouse embryo development. *Biochem Biophys Res Commun* 195(2) : 769-775, 1993.

13) Kawasaki H et al. : Induction of midbrain dopa-

minergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 28(1) : 31-40, 2000.