

矢野修一 学位論文審査要旨

主 査 河 合 康 明
副主査 重 政 千 秋
同 久 留 一 郎

主論文

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

(マウス胚性幹細胞由来Nkx2.5陽性心筋細胞に発現するHCN遺伝子および I_f 電流の心筋分化に依存した変化に関する研究)

(著者：矢野修一、三明淳一郎、水田栄之助、眞鍋香澄、Bahrudin、森川久未、荒川慶太、佐々木紀仁、井川修、重政千秋、山本康孝、森崎隆幸、日高京子、倉田康孝、吉田明雄、汐田剛史、檜垣克美、二宮治明、李鐘国、白吉安昭、久留一郎)

平成20年 Biomedical Research 29巻 195頁～203頁

学 位 論 文 要 旨

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

(マウス胚性幹細胞由来Nkx2.5陽性心筋細胞に発現するHCN遺伝子および I_f 電流の心筋分化に依存した変化に関する研究)

過分極誘発性陽イオンチャネル (I_f) は、4つの異なったHCN遺伝子ファミリー (HCN1~4) によりコードされ、心臓や神経に広く発現し洞結節やプルキンエ線維において自動能発生に重要な役割を演じている。また成獣ウサギ刺激伝導系細胞においてはHCN1、2、4の発現が報告されている。発生段階における I_f の遺伝子発現ではHCN2から4へのサブタイプの変化や、経時的な発現量の増加が報告されている。しかしながら、発生段階における発現様式の変化はいまだ不明な点が多い。そこで本研究では、心筋分化早期に発現し心筋前駆細胞マーカーであるNkx2.5 遺伝子を導入したES細胞株であるHcgp7株を用いて、マウスES細胞由来Nkx2.5 陽性心筋前駆細胞に発現するHCN遺伝子および I_f 電流の心筋分化に依存した変化について研究を行った。

方 法

実験には129/01a由来のES細胞系統であるHt7を用いた。この細胞には片側のOct-3/4の遺伝子座にハイグロマイシン耐性遺伝子が導入されており、ハイグロマイシン存在下でフィーダー細胞なしで未分化ES細胞のみを選別維持できる。そこで、Ht7の片側の遺伝子座に存在する心筋特異的転写因子Nkx2.5のプロモーター領域の下流に、相同性遺伝子組み替えを用いてGFP遺伝子をノックインしたHt7ES細胞を作成し、これをHcgp7とした。これらの細胞は全て、0.1%ゼラチンでコートしたφ100 mm dishの上で培養した。その後Hanging Drop法を用いて分化誘導を行い、FACSを用いてNkx2.5-GFP陽性細胞分取後に、リアルタイムRT-PCR法と免疫染色法による遺伝子ならびにタンパク発現解析、及びパッチクランプ法による電気生理学的解析を行った。

結 果

古典的 I_f 阻害薬であるCsClは分化誘導後7日目の胚様体の自動能をほとんど抑制しなかったが、15日目には有意に抑制した。HCN遺伝子によりコードされる I_f はCsCl感受性自動能

に重要な役割を示すので、本研究では分化誘導中の胚様体のHCN遺伝子転写活性量を測定したところ、すべてのHCN遺伝子群(1~4)の転写活性は分化誘導中に有意に増加した。CsCl1に対する自動能細胞の反応は、心筋細胞のみならず胚様体から分化した他の種類の細胞の反応も含むために、本研究ではNkx2.5-GFP陽性細胞を心筋前駆細胞として定義した。これまでFlk1陽性中胚葉細胞から自動能を持った心筋細胞に分化する可能性が示されているが、分化誘導後7日目のNkx2.5-GFP陽性細胞は、Flk1陽性細胞の分布に重ならないことをFACSで確認した。そしてRT-PCR法により転写因子の発現解析を行ったところ、Nkx2.5-GFP陽性-Flk1陰性細胞は、Nkx2.5、GATA4、Mef2C及びT型CaチャンネルCav3.2が発現していた。また、Nkx2.5-GFP陰性-Flk1陽性細胞はFlk1およびGATA4を発現していた。Nkx2.5-GFP陰性-Flk1陰性細胞はGATA4のみを発現していた。これらの結果はNkx2.5-GFP陽性細胞とFlk1陽性細胞の分布が異なることを示している。また、分化誘導後7日目と15日目の胚様体からNkx2.5-GFP陽性細胞を単離し、RT-PCR法でHCN遺伝子発現量を検討したところ、分化誘導後15日目の細胞では、HCN1と4の遺伝子が発現したが、7日目の細胞では発現していなかった。HCN1と4のチャンネル蛋白は分化誘導後15日目のNkx2.5-GFP陽性細胞に認められたが、分化誘導後7日目では認められなかった。Flk1陽性細胞は分化誘導後7日目及び15日目いずれでもHCN遺伝子群を発現しなかった。このことは本研究の実験条件では、分化誘導中にNkx2.5-GFP陽性細胞がHCN1及び4遺伝子が発現することを示している。次にNkx2.5陽性細胞のCsCl1感受性自動能と I_f 電流量の分化依存性変化について観察した。分化誘導後7日目と15日目のNkx2.5-GFP陽性細胞に及ぼすCsCl1の効果は、7日目では認められないが、15日目では自動能を有意に抑制した。そこで、本研究では分化誘導後7日目と15日目のNkx2.5-GFP陽性細胞での I_f 電流の密度とキネティクスを比較した。 I_f 電流は7日目の細胞では記録されないが、15日目の細胞では記録された。この事実は、Nkx2.5-GFP陽性細胞のCsCl1による自動能抑制と一致した。テルカレントから測定した活性化曲線は1/2活性化電位が-96.2 mVで、スロープ係数が9.2であり、HCN4由来 I_f 電流に近いことが示された。

考 察

胚様体から形成されるマウスES細胞由来心筋前駆細胞の I_f 電流活性は、分化初期に小さく、分化後期に大きくなることが報告されている。ヒトES細胞による報告によると、 I_f 電流とHCN遺伝子発現は未分化状態で既に検出され、心筋分化の後期に減少する。また胚様体は異なった心腔に分化する種々の細胞を含んでいる。このことが分化誘導中の I_f チャンネル活性や、HCN遺伝子転写活性の報告の違いに反映される。したがって幹細胞のマーカーを追跡することは、分化中の心筋前駆細胞の性質の変化を明らかにするための有効な方法で

あり、この方法を用いてマウスES細胞由来Flk-1陽性中胚葉細胞が自律拍動する心筋細胞に分化するという報告がなされた。また最近、OP9間葉系細胞と共培養されたES細胞由来Flk-1陽性前駆細胞では、自律拍動、 I_f 電流及びHCN1と4が有意に減少すると報告された。本研究では、ほとんどのNkx2.5陽性細胞はFlk-1陰性であった。Flk-1陽性細胞が分化後期にHCN遺伝子を発現しないという事実と合わせて考えると、Flk-1陽性細胞は、本研究の実験条件ではCsCl感受性自動能やHCN1及び4の転写活性とタンパク発現の変化を伴わないことを示唆する。本論文は、Nkx2.5陽性心筋前駆細胞がその分化後期にHCN1と4の遺伝子を発現することを示した最初の論文である。洞結節細胞では、HCN1と4の遺伝子を発現することが知られており、本研究の結果は、これまでのNkx2.5陽性細胞の一部が心房筋や心室筋だけではなく、長期間の培養の後に洞結節細胞に良く似た電気生理学的な性質を示すという報告に一致する。ごく最近になってNkx2.5は遺伝子改変マウスモデルでのHCN4遺伝子の転写活性の抑制を示すことが報告されている。この報告と本研究の結果との違いは、実験条件の差によるものかもしれないが今後の検討を要する。

結 論

本研究では、胚様体形成法による分化誘導中にNkx2.5-GFP陽性細胞のCsClに対する自動能の感受性、HCNタンパクの発現や I_f 電流の変化に関して検討し、Nkx2.5-GFP陽性細胞では、分化誘導中にHCN1及び4の転写活性、タンパク質発現量、Csに対する自動能の感受性および I_f 電流活性が増加していた。