

# 第 18 回 小児心血管分子医学研究会

## プログラム・抄録集

日 時：平成 27 年 7 月 16 日（木） 18:30～20:40  
会 場：ホテル日航東京 第 5 会場 1 階アポロン A  
〒135-8625 東京都港区台場 1-9-1 TEL 03-5500-5500（代表）

## 第 18 回 小児心血管分子医学研究会

日 時： 平成 27 年 7 月 16 日（木） 18 時 30 分～20 時 40 分

会 場： ホテル日航東京 第 5 会場 1 階アポロン A  
〒135-8625 東京都港区台場 1-9-1 TEL 03-5500-5500（代表）

参 加 費： 1,000 円

当番世話人： 大阪大学大学院医学系研究科小児科学 小垣 滋豊

### 【小児心血管分子医学研究会 世話人】

代表世話人： 東京慈恵会医科大学細胞生理学 南沢 享

世 話 人：	京都府立医科大学小児科	池田 和幸
	国立循環器病センター小児循環器科	岩朝 徹
	日本医科大学小児科	小川 俊一
	名古屋大学医学部附属病院小児科	加藤 太一
	東京女子医科大学八千代医療センター小児科	濱田 洋通
	富山大学医学部小児科	廣野 恵一
	三重大学医学部小児科	三谷 義英
	慶應義塾大学医学部小児科	山岸 敬幸
	横浜市立大学医学部循環制御医学	横山 詩子
	大阪大学大学院医学研究科小児科学	小垣 滋豊
監 事：	名古屋大学大学院医学系研究科小児科学	加藤 太一

事 務 局： 〒105-8461 東京都港区西新橋3-25-8  
東京慈恵会医科大学細胞生理学内  
小児心血管分子医学研究会事務局  
TEL 03-3433-1111 FAX 03-3433-1279

小児心血管分子医学研究会 過去の学術集会

回	開催年月	開催地	当番世話人
第1回	2003年7月	神戸	白石 公
第2回	2003年11月	京都	中川 雅生
第3回	2004年6月	東京	中西 敏雄
第4回	2004年11月	京都	三谷 義英
第5回	2005年7月	東京	小川 俊一
第6回	2006年1月	東京	寺井 勝
第7回	2006年7月	名古屋	市田 露子
第8回	2007年1月	東京	白石 公
第9回	2007年7月	東京	山岸 敬幸
第10回	2008年1月	東京	小垣 滋豊
第11回	2008年7月	福島	中川 雅生
第12回	2009年7月	神戸	三谷 義英
第13回	2010年7月	東京	南沢 享
第14回	2011年7月	福岡	太田 邦雄
第15回	2012年7月	京都	山岸 敬幸
第16回	2013年7月	東京	星合 美奈子
第17回	2014年7月	岡山	濱田 洋通
第18回	2015年7月	東京	小垣 滋豊

第 18 回小児心血管分子医学研究会  
プログラム

「心筋細胞研究の最前線を探る ー発生から機能までー」

開会の挨拶 18 : 30~18 : 35

第 18 回小児心血管分子医学研究会 当番世話人

大阪大学大学院医学系研究科小児科学 小垣 滋豊

特別講演 18 : 35~19 : 35

座長 大阪大学大学院医学系研究科 小児科学 小垣 滋豊

心筋細胞の力学を観るヒント

「細胞・組織の力学：走査プローブ顕微鏡計測の最前線」

北海道大学大学院情報科学研究科 生命人間情報科学専攻

バイオエンジニアリング講座 細胞生物工学研究室 教授

岡嶋 孝治 先生

一般演題・宿題報告 19 : 35~19 : 55

座長 大阪大学大学院医学系研究科 小児科学 小垣 滋豊

心筋細胞の発生を観る

「新しい心筋前駆細胞表面マーカーの同定」

大阪大学大学院医学系研究科 小児科学

石田 秀和

教育講演 19 : 55~20 : 40

座長 大阪大学大学院医学系研究科 小児科学 高橋 邦彦

心筋細胞の機能を観る

「ミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV の活性調節因子 Higd1a」

大阪大学大学院医学系研究科 医化学講座 助教 新谷 泰範 先生

閉会の挨拶 20 : 40

次回当番世話人

横浜市立大学医学部循環制御医学

横山 詩子

## 特別講演

### 細胞・組織の力学：走査プローブ顕微鏡計測の最前線

北海道大学情報科学研究科 教授 岡嶋 孝治

#### 1. はじめに

生細胞は、弾性と粘性の性質をあわせもつ粘弾性体である。細胞の粘弾性（レオロジー）は、様々な細胞機能や細胞の状態に応じて変動することが知られている。従って、細胞のレオロジー特性を明らかにすることは、細胞機能を解明するための基礎と言っても過言ではない。原子間力顕微鏡（atomic force microscopy : AFM）やイオンコンダクタンス顕微鏡（scanning ion conductance microscopy : SICM）は、細胞の力学物性を高精度で計測することができる強力な顕微鏡技術である。本講演では、AFM や SICM による細胞物計測の現状を紹介したい。

#### 2. 原子間力顕微鏡：細胞レオロジーの統計解析

粘弾性体（レオロジー）である細胞の弾性率を定量的に評価するためには、周波数領域または時間領域の力学測定が必要である。多数の細胞のレオロジーを計測できる方法として、主に、MTC法（magnetic twisting cytometry）<sup>1</sup>、光ストレッチャー法（optical stretcher）<sup>2</sup>、AFM<sup>3</sup>法の3種類がある（図1）。MTC法は、細胞表面に接着した磁気ビーズに、変動磁場を加え、磁気ビーズの変位量から細胞の弾性率を換算する。光学顕微鏡の視野内に存在する多数の細胞を同時に計測することができるため、弾性率のアンサンブル平均を高精度に決定できる。一方で、磁気ビーズは細胞表面上にランダムに接着するため、個々の細胞測定値の誤差は比較的大きく、細胞診断に適さない。

光ストレッチャー法は、マイクロ流路内で浮遊した細胞をレーザー光圧により捕捉し、その捕捉力による細胞の変形量から弾性率を測定する。本手法は、単一細胞全体の弾性率を測定できるという利点をもつ。一方で、接着細胞を浮遊させてから測定しなければならないため、接着状態の細胞の弾性率とは異なる可能性があることに注意しなければならない。

原子間力顕微鏡（AFM）は、カンチレバーの先端に装着したプローブと細胞サンプルとを接触させ、カンチレバーのたわみ量から、サンプルの局所領域の力学特性を測定することができる。AFM プローブと細胞とは間欠的な物理接触であるため、接着細胞への侵襲度は MTC と比べて小さいという利点をもつ。

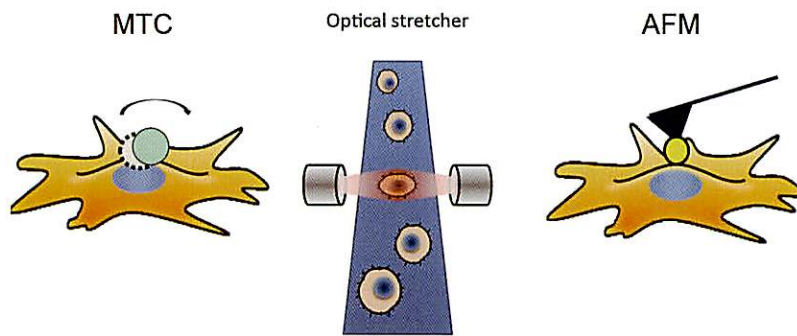


図1 細胞の粘弾性(レオロジー)の測定方法.左から, MTC 法, 光ストレッチャー法, AFM 法の概念図.

図2は, 典型的な細胞の複素弾性率  $G^*$  の実部 (貯蔵弾性率)  $G'$  と虚部 (損失弾性率)  $G''$  の周波数依存性を示す<sup>4</sup>. 過去の研究を総合すると, 周波数領域が  $10^{-2}\text{Hz}$ - $10^3\text{Hz}$  において,  $G'$  は周波数  $f$  の単一べき関数となり, そのべき指数  $\alpha$  は細胞骨格構造に強く依存することが知られている<sup>5</sup>. また,  $G''$  は  $G'$  の単一べき関数項とニュートン粘性による損失項の加算として表すことができる.  $G'$  や  $G''$  の大きさは細胞の種類や状態により異なるが, 上記の周波数特性は, 多くの細胞において普遍性であると考えられている<sup>5</sup>.

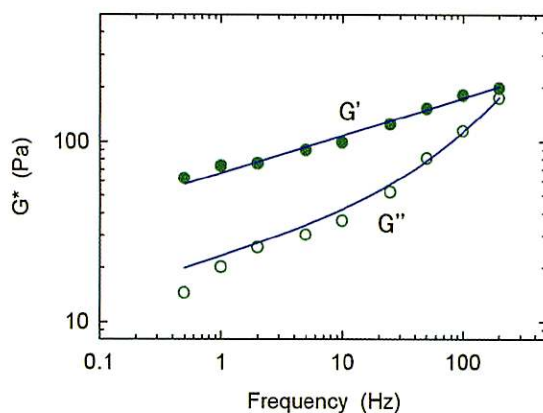


図2 線維芽細胞 (NIH3T3 細胞) の貯蔵弾性率  $G'$  (色丸) と損失弾性率  $G''$  (白丸) の周波数依存性.

生体サンプルの諸性質を調べる上で, その個性の大きさが問題になることである. 単一細胞の力学特性も例外ではない. 同じ培養ディッシュ内の細胞であっても, 個々の細胞の粘弾性は無視できないほど大きくばらつく. したがって, 細胞の力学特性を定量化するためには, 細胞の個性を評価する技術が必要となる. 定量的な細胞力学計測を実現するために, マイクロ加工基板を用いた AFM 計測法を提案した (図3)<sup>4, 6</sup>. マイクロ加工基板上に播種した細胞は, 個々の細胞の形状が整っているため, 細胞レオロジーの細

胞内位置依存性を容易かつ正確に計測できる. マイクロ加工基板上的細胞の貯蔵弾性率  $G'$  と損失弾性率  $G''$  の細胞数分布を図 3 右図に示す. この結果から次の性質が明らかになった: (1)  $G'$  と  $G''$  は対数正規分布を示す. 従って, 細胞の弾性率の平均値は幾何平均になる. (2) 対数正規分布の標準偏差は, 周波数の増加とともに, 減少する. そして, 細胞力学特性の標準偏差 (個性)  $\sigma$  が周波数  $f$  に対して,  $\log f$  の関数になることを発見した (図 4). この個性の挙動は,  $G'$  の単一べき関数挙動の理論と一致することから, 細胞の弾性率のべき乗則が, 細胞力学の本質的な性質の 1 つであることが明らかになった.

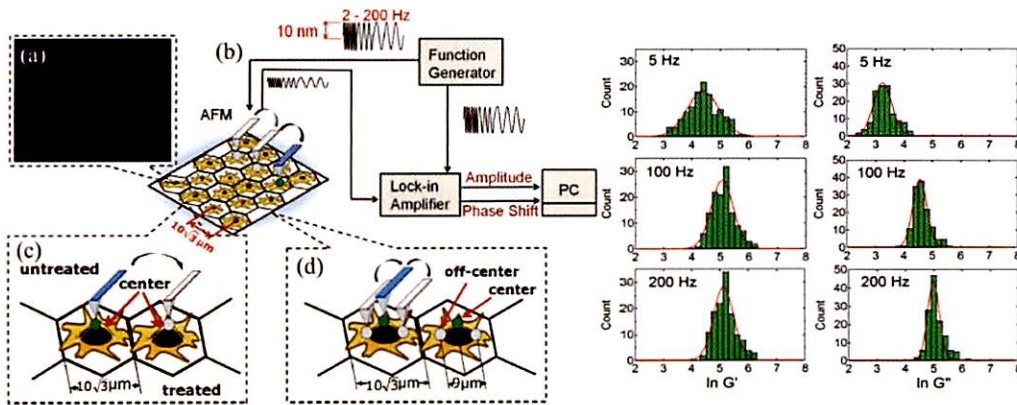


図 3 (左) 細胞マイクロアレイ上の配列化した細胞の顕微鏡写真. 細胞核を染めて観察している. (b) 細胞マイクロアレイを用いた AFM 測定概念図. AFM のフォースモジュレーションモードを用いて, 個々の細胞レオロジーを測定する. (右) 線維芽細胞 (NIH3T3 細胞) の貯蔵弾性率  $G'$  (左) と損失弾性率  $G''$  (右) の細胞数分布. 周波数は, 上から, 5, 100, 200 Hz である. 対数正規分布に近い分布を示す.

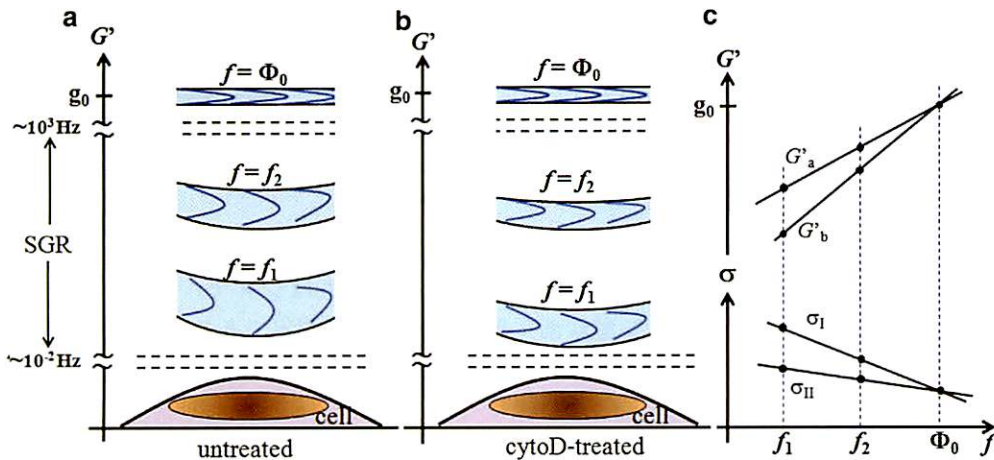


図 4 細胞の弾性率 (貯蔵弾性率) の標準偏差 (ばらつき) の模式図. 帯状の幅が細胞弾性率の分布幅を示している. 細胞の中心付近でばらつきが最大になり, 核の端に向かうにつれて減少する. ある高周波数  $g_0$  において, 細胞弾性率の空間依存性は消滅する. (a) 未処理の細胞. (b) 細胞骨格の一種であるアクチン線維を破壊した細胞. (c) 弾性率と弾性率の標準偏差 (個性)  $\sigma$  の周波数依存性の模式図. アクチン線維を破壊すると, 弾性率も標準偏差も減少することを表している.

### 3. イオンコンダクタンス顕微鏡：細胞膜の揺らぎ

イオンコンダクタンス顕微鏡 (SICM) <sup>7, 8</sup> は、生細胞表面のナノスケールの構造・物性を調べることができるプローブ顕微鏡である。SICM では (図 5 a), ガラスピペットを引き伸ばした (通常, 先端径数 10nm から 100nm 程) 微小孔をもつナノピペットを用いる (図 5 b). 電極を挿入し, 内部を電解質溶液で満たしたガラスナノピペットともう片方の電極との間に直流電圧を印可し, 微小孔を流れるイオン電流を測定する. ピペット探針が試料の表面に近づくと, 試料表面の存在が” 障害” となってイオン電流が流れにくくなり, その結果, イオン電流値は表面近傍で急激に減少する (図 5 c). このイオン電流の減少は, 試料表面とピペット探針との距離に依存するので, イオン電流値から試料表面を非接触で検知することができる. イオン電流値の減少量を一定に保ちながら水平方向に走査することで, 非接触で表面形状観察ができる. 実際には, 形状変化が大きいサンプルを観察できるように, 探針・サンプル間の距離を間欠的に変化させてイメージング走査を行うモードが用いられている<sup>9</sup>. このように, SICM は, AFM のような接触計測法では観察が困難であった柔らかい細胞膜の形状を高い分解能で観察することが可能である (図 5 右図).

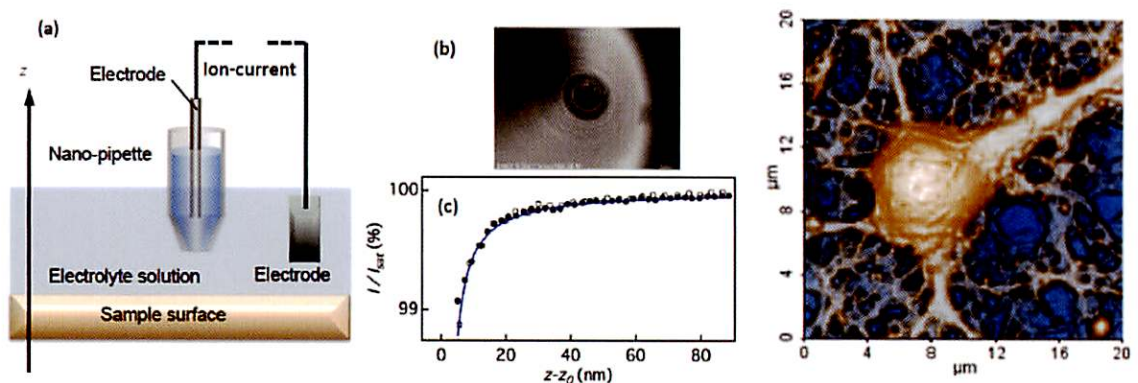


図5 (a) イオンコンダクタンス顕微鏡の装置概要図. (b) 探針先端の電子顕微鏡写真. (c) イオン電流の探針・表面間距離依存性. 黒丸はシリコン基板, 白丸はジメチルポリシロキサン (PDMS) 基板での測定結果. どちらもリン酸緩衝生理食塩水中での測定である. (右図) 培養ディッシュ上に培養したマウス神経細胞の SICM イメージの例.

SICMは、細胞表面の形状観察だけでなく、細胞膜表面の揺らぎ現象の計測にも利用できる<sup>10</sup>. 前述の通り SICM のイオン電流値は、探針と試料表面との間の距離に依存する (図 5 c). 以後、この試料-探針間の距離に対するイオン電流値の曲線を、イオン電流曲線と呼ぶ. このイオン電流曲線を解析すると、細胞表面の揺らぎ量を半定量的に見積もることができる.



イオン電流曲線の関数形については、いくつかのモデルが提案されている。試料平面に垂直な軸を $z$ 軸として、 $z_0$ を試料表面の位置、 $z$ を探針の位置とすると、良い近似で、下記の式でフィットできることが知られている。

$$I_0(z-z_0) = I_{\text{sat}} \left[ 1 + \frac{\xi}{z-z_0} \right]^{-1}$$

ここで、 $\xi$ はピペットの形状や電解質の導電率に依存した測定条件に依存する変数、 $I_{\text{sat}}$ は、探針が試料表面から十分遠方の位置のイオン電流である。

試料表面が固定されていれば、 $z_0$ は定数であるが、ここで、試料表面の位置が時間とともに変動している場合のイオン電流を考えてみたい。試料表面の位置が時間と表面に水平な空間 ( $r = (x, y)$ 平面) の関数として変動するとき、表面の位置 $z_s(r, t)$ は、下記のように書くことができる (図6) :  $z_s(r, t) = z_0(r) + \delta z_s(r, t)$ 。ここで、右辺の第1項 $z_0(r)$ は試料表面の変動の平均値、第2項 $\delta z_s(r, t)$ は変動成分であり、 $\langle \delta z_s(r, t) \rangle = 0$ である。ここで、ブラケット $\langle X \rangle$ は、物理量 $X$ の時間平均とする。

この細胞膜表面の位置 $z_s$ をSICMで検知する方法として、最も単純に考えられる方法は、探針を細胞表面近傍に配置し、イオン電流  $I$  の変動を測定する方法であろう。しかし、イオン電流は微弱であるため、イオン電流ノイズと表面揺らぎによるイオン電流変化とを時系列データやそのスペクトルから分離することが極めて難しい。一方で、イオン電流曲線のデータには表面位置の情報が含まれている。したがって、イオン電流曲線を解析することで、平均量ではあるが精密な表面変動量を見積もることができる。ここでは、便宜上、細胞表面がガウス確率分布  $P$  で揺らぐと仮定し、見かけの揺らぎ量 $a_s = \langle \delta z_s^2 \rangle^{1/2}$ を定義した (図6)。このとき、表面の位置の確率分布は、次のように与えられる。

$$P(z_s - z_0, \langle \delta z_s^2 \rangle) = \frac{1}{\sqrt{2\pi \langle \delta z_s^2 \rangle}} \exp \left\{ -\frac{(z_s - z_0)^2}{2 \langle \delta z_s^2 \rangle} \right\}$$

そして、時間平均のイオン電流は、

$$\langle I(z - z_0, \langle \delta z_s^2 \rangle) \rangle = \int_{-\infty}^{\infty} I_0(z - z_s) P(z_s - z_0, \langle \delta z_s^2 \rangle) dz_s \quad (1)$$

と表現することができる。

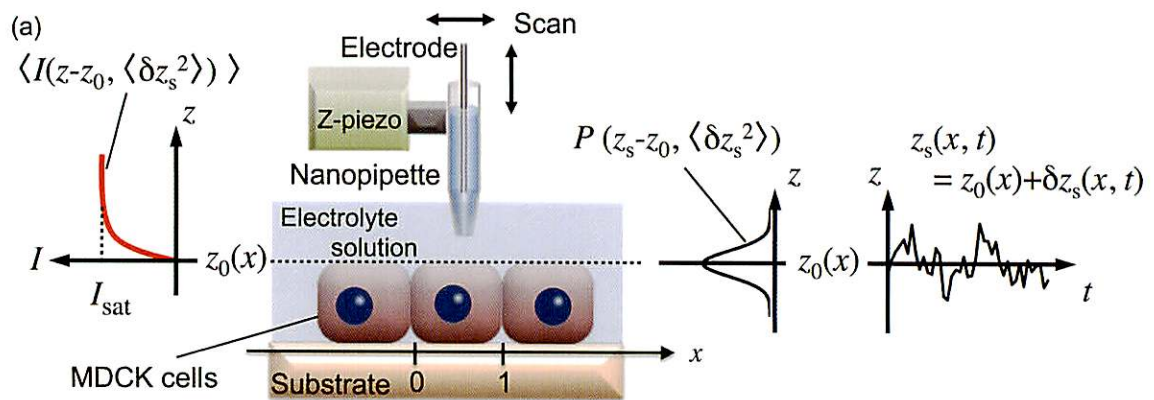


図6 SICMによる細胞膜表面の揺らぎ計測法の概念図.

細胞膜表面で測定したイオン電流曲線は、細胞表面位置をガウス確率分布に仮定したモデル計算 (式1) でうまくフィットできる (図7(a)). この図から分かるように、化学的に固定した細胞 (固定細胞) で測定したイオン電流曲線は急峻に電流が減少し、生細胞のイオン電流曲線は緩やかに減少する. この結果は、生細胞の細胞膜揺らぎが、固定細胞のそれよりも大きいことを端的に示している.

図7(b)は、1細胞内の断面における細胞膜揺らぎ量を測定した結果を示している. 横軸の  $x=0$  と  $x=1$  が1細胞の両端であり、 $x=1/2$  が1細胞の中心である. 固定細胞の膜揺らぎ量は、6 nm 程であり、細胞内の位置に依存せずに一定であることが分かる. 一方で、天然の生細胞の細胞膜表面揺らぎ量は、固定細胞の約10倍に増加し、細胞の両端から中心に向かって細胞膜揺らぎ量が増大する. 興味深いことに、この細胞膜揺らぎ量は、細胞骨格の1つである微小管を脱重合 (破壊) しても変化しない. また、アクチン繊維を破壊すると、細胞膜揺らぎは大きく増加すること、そして、生細胞に見られた細胞膜揺らぎ量の空間依存性は消滅することから、アクチン繊維と細胞膜との相互作用により細胞膜表面の揺らぎ量が調節されていることが示唆される. このように、SICMにより細胞膜の動的物性を直接測定することにより、細胞膜の揺らぎ量の空間特性とその細胞骨格構造の依存性が明らかになった.

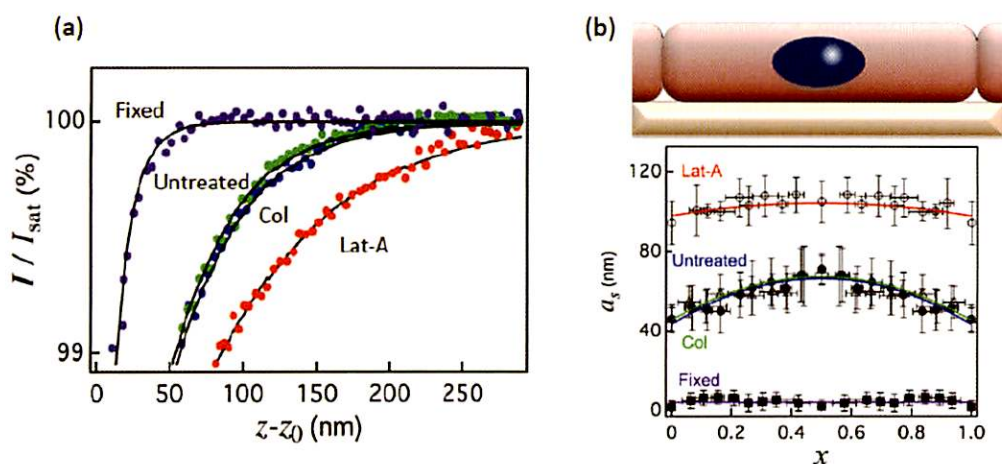


図7 (a) イオン電流曲線 (色丸) と(4)式によるフィット結果 (曲線). 固定細胞 (Fixed), 未処理細胞 (Untreated), 微小管を破壊した細胞 (Col: コルヒチン処理), アクチン繊維を重合阻害した細胞 (Lat-A: ラトランキュリン A 処理). (b) 細胞膜表面の空間依存性. 固定細胞 (Fixed), 未処理細胞 (Untreated), 微小管を破壊した細胞 (Col), アクチン繊維を重合阻害した細胞 (Lat-A)

#### 4. まとめ

AFM とマイクロ加工基板技術を組み合わせることで, 細胞固有の弾性率を定量化できる. SICM を用いて細胞表面のダイナミクスを探索することができる. 細胞の力学特性の理解には, 分子レベルのミクロな物性と細胞単位レベルの物性 (弾性率や運動性) の両方のアプローチが不可欠である. 本稿では, 後者について述べたが, AFM や SICM の優れた点は, これら両方のスケールを計測することができる点である. 細胞・組織の力学計測において, AFM は今後益々重要な計測技術になるであろう.

#### 参考文献

1. B. Fabry, G. N. Maksym, J. P. Butler, M. Glogauer, D. Navajas and J. J. Fredberg, *Phys. Rev. Lett.* **87** (14) (2001).
2. J. Guck, S. Schinkinger, B. Lincoln, F. Wottawah, S. Ebert, M. Romeyke, D. Lenz, H. M. Erickson, R. Ananthkrishnan, D. Mitchell, J. Kas, S. Ulvick and C. Bilby, *Biophys. J.* **88** (5), 3689-3698 (2005).
3. J. Alcaraz, L. Buscemi, M. Grabulosa, X. Trepat, B. Fabry, R. Farré and D. Navajas, *Biophys. J.* **84** (3), 2071-2079 (2003).
4. S. Hiratsuka, Y. Mizutani, M. Tsuchiya, K. Kawahara, H. Tokumoto and T. Okajima, *Ultramicroscopy* **109**, 937-941 (2009).
5. P. Kollmannsberger and B. Fabry, *Annual Review of Materials Research*, Vol 41 **41**, 75-97 (2011).
6. P. Cai, Y. Mizutani, M. Tsuchiya, J. M. Maloney, B. Fabry, K. J. Van Vliet and T. Okajima, *Biophys. J.* **105** (5), 1093-1102 (2013).
7. P. K. Hansma, B. Drake, O. Marti, S. A. C. Gould and C. B. Prater, *Science* **243** (4891), 641-643 (1989).
8. Y. E. Korchev, C. L. Bashford, M. Milovanovic, I. Vodyanoy and M. J. Lab, *Biophys. J.* **73** (2), 653-658 (1997).

9. P. Novak, C. Li, A. I. Shevchuk, R. Stepanyan, M. Caldwell, S. Hughes, T. G. Smart, J. Gorelik, V. P. Ostanin, M. J. Lab, G. W. J. Moss, G. I. Frolenkov, D. Klenerman and Y. E. Korchev, *Nature Methods* **6** (4), 279-281 (2009).
10. Y. Mizutani, M.-H. Choi, S.-J. Cho and T. Okajima, *Applied Physics Letters* **102** (17) (2013).

## 一般演題

### 新しい心臓前駆細胞特異的表面マーカーの同定

大阪大学大学院医学系研究科 小児科学

William Harvey Research Institute, Queen Mary University of London

石田 秀和

#### (背景)

心不全は我が国において最も重要な死因の一つであり、近年、心筋再生療法の基礎研究とその臨床応用が注目を浴びている。心筋再生療法には、1. ES細胞やiPS細胞由来の心筋細胞<sup>1</sup>、あるいは間葉系幹細胞や骨格筋芽細胞等を用いた細胞移植療法<sup>2,3</sup>、2. 成体心筋幹細胞を取り出し培養して移植する方法<sup>4</sup>、3. 心筋線維芽細胞を心筋細胞に直接転換する方法<sup>5</sup>、の3つが主として模索されている。これらいずれの方法においても、心臓初期発生における、中胚葉細胞から心筋前駆細胞/心筋細胞への運命決定の制御メカニズムや、あるいは心筋前駆細胞の細胞生物学的特性といった発生生物学的な基礎真理の解明が、より効率的で安全な心筋再生療法の発展のためには必要不可欠と考えられる。哺乳類において、心臓原基は側板中胚葉の前方領域に由来し、一次心臓領域と二次心臓領域という異なる細胞集団で構成されている。一次心臓領域はその後の左心室と心房の一部に寄与し、二次心臓領域はその後の右心室と流出路、心房の一部に寄与する。最近我々は、一次心臓領域の心臓前駆細胞は、初めに転写因子 *Tbx5* のみを発現する細胞集団として出現し、心筋細胞のみにしか分化できない細胞運命が限定された集団であることを明らかにした<sup>6</sup>。しかし、心筋前駆細胞のアイデンティティの獲得、そして一次および二次心臓領域の相違を決定する分子メカニズムについては、依然明らかになっていない。

この分野の進展を妨げている大きな理由の一つは、発生初期における心筋前駆細胞特異的表面マーカーが乏しい事にある。もし特異的表面抗原が同定されれば、誰もが簡単に心筋前駆細胞を認識・単離でき、心筋前駆細胞に関する理解が飛躍的に深まるだけでなく、心筋前駆細胞を用いた細胞移植療法の開発や、成体内における心筋前駆細胞の特性の解明など、さらなる臨床応用への期待も高まる。そこで我々はマウス胚心筋前駆領域由来の single cell cDNA を用いた次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現プロファイリングによって、新たな表面マーカーのスクリーニングを行った。

## (結果)

### 1. マウス初期胚の心筋前駆領域からの single cell cDNA ライブラリ作成と発現プロファイリング

我々はまず、マウス 7.5 日胚の心臓前駆領域を顕微鏡下で単離し、酵素処理にて単一細胞に分離した後、既報の方法に従って single cell 由来 cDNA ライブラリを作成した<sup>7,8</sup>(図 1)。当然この中には心筋前駆細胞以外の cDNA も混入しているため、心筋前駆細胞由来の cDNA として、転写因子 *Tbx5* と *Nkx2-5* の発現が認められる cDNA を選択した。この cDNA に対して次世代シーケンサーを用いた網羅的発現解析を行い、心筋前駆細胞において発現が上昇している遺伝子の同定を行った。これらの中で、細胞表面に発現するタンパクをコードしてかつ RNA hybridization 用のプローブと抗体が手に入る遺伝子を検討対象とすることにした。まず Whole mount in situ hybridization (WISH)によって、マウス初期胚(E7.5)での発現パターンを実際に確認した。すると 1 つの遺伝子 (*CSA1*; *Cardiac progenitor Specific Antigen 1* 仮称) が、心臓前駆領域にて一過性に発現していることが判明した。

### 2. マウス初期胚における CSA1 の発現パターン解析

E7.25-E8.75 のマウス胚を用いた WISH による発現パターン解析によると、*CSA1* は Late Allantoic Bud ステージから側板中胚葉の前方領域に発現が認められ、Somite 5 ステージにかけて、心臓前方領域と一致して発現が認められた。興味深いことに、心筒が完成しルーピングが始まる Somite 10 ステージ以降では、その発現は急速に低下していた。すなわち、*CSA1* は心臓前駆領域にて一過性に発現し、心筋細胞成熟とともに発現が低下することが示唆された(図 2)。次に、*CSA1* のタンパクレベルでの発現解析と、一次/二次心臓領域特異性を検討するため、Somite 3 ステージの胚で連続切片を作成し、それぞれの心臓領域特異的とされる転写因子、*Tbx5*(一次心臓領域)、*Hcn4*(一次心臓領域)、*Isl1*(二次心臓領域)、*Nkx2-5*(両心臓領域)との共染を行った。すると、中胚葉領域における *CSA1* 陽性細胞は *Nkx2-5* 陽性細胞と完全に一致し、一次心臓領域マーカー (*Tbx5*, *Hcn4*) と二次心臓領域マーカー (*Isl1*) の合わせた領域と一致することが判明した。すなわち、*CSA1* は両心臓領域の心筋前駆細胞で発現していることが明らかとなった(図 3)。

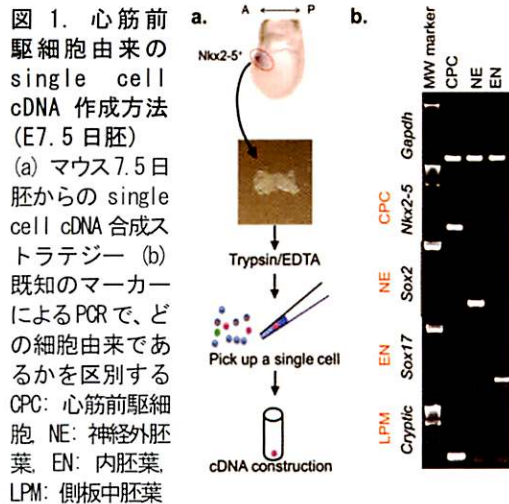
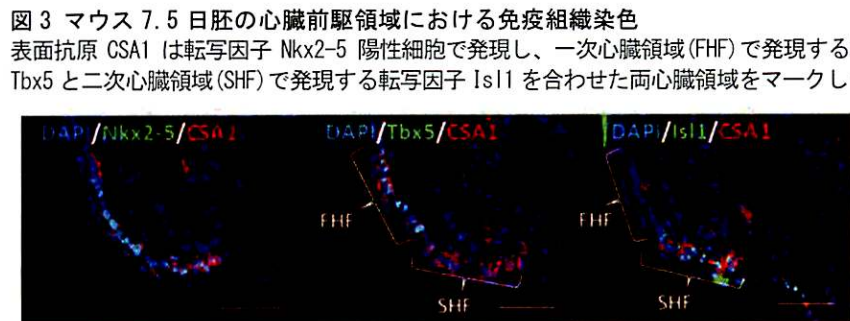
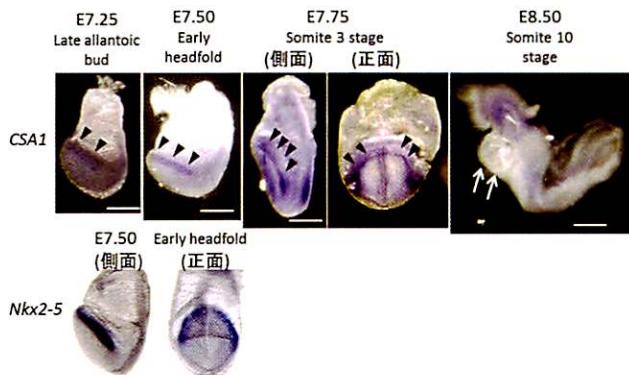


図 1. 心筋前駆細胞由来の single cell cDNA 作成方法 (E7.5 日胚)  
 (a) マウス 7.5 日胚からの single cell cDNA 合成ストラテジー (b) 既知のマーカによる PCR で、どの細胞由来であるかを区別する  
 CPC: 心筋前駆細胞 NE: 神経外胚葉 EN: 内胚葉 LPM: 側板中胚葉

図 2. マウス 7.25-8.5 日胚における Whole mount in situ hybridization.  
 CSA1 は一過性に心臓前駆領域に発現し (矢頭)、原始心筒形成、ルーピングとともに心臓での発現が消失する (矢印)。



### 3. CSA1 の心筋細胞分化における機能解析

次に、CSA1 が心筋細胞分化において果たす機能を解析するため、我々は最近注目されている簡便なゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システム<sup>9</sup>を用いて、マウス ES 細胞で CSA1 のノックアウトを行った。このノックアウト ES 細胞を心筋細胞に分化誘導したところ、分化能はやや低下していた。そこで、CSA1 のファミリータンパクである CSA1-family protein A (CFA; 仮称)を同時にノックアウトしたダブルノックアウト ES 細胞株を樹立したところ、心筋分化能が著しく障害されていた。CSA1 ノックアウト ES 細胞における CFA 発現を定量的 PCR で確認したところ、有意に上昇しており、CSA1 の機能は CFA 発現上昇によって代償されていることが示唆された。さらにこの表現形を *in vivo* で確認するために、CRISPR/Cas9 システムの受精卵直接注入法<sup>10</sup>を用いて、ダブルノックアウトマウス胚を作成した。E8.5 で回収したダブルノックアウト胚では WISH にて ANF の発現が著しく低下しており、心筋細胞分化の障害が裏付けられた。以上の実験により、CSA1 は心筋細胞分化において重要な役割を果たしていることが示唆

されたが、その下流および上流のシグナル経路については依然不明であり、今後の研究課題である。

#### 4. マウス ES 細胞の心筋細胞分化誘導系における CSA1 の発現解析

さらに、CSA1 が ES 細胞由来の心筋前駆細胞に対して、表面マーカーとしての実用性があるかどうかを確認するために、マウス ES 細胞からの心筋細胞分化誘導系<sup>11</sup>を用いて発現パターン解析を行った。まず、定量的リアルタイム PCR 解析を行い、CSA1 が分化誘導開始後 7 日目に一過性の発現ピークを示すことを確認した(図 4)。我々の分化誘導系では心筋細胞の自己拍動は 8 日目から確認されており、この結果は、CSA1 は心筋前駆細胞で一過性に発現し、心筋細胞の成熟とともに発現が低下する、というマウス胚における WISH の結果と一致するものであった。次にフローサイトメトリーを用いて、CSA1 が ES 細胞由来の心筋前駆細胞表面で実際に発現しているかどうかを確認した。CSA1 はまず、分化誘導 4 日目より発現が認められ、さらに以前報告された心臓血管前駆細胞の表面マーカーである *Pdgfra* と *Kdr* とも一致して発現していた。このうち *Kdr* は 6 日目には発現がほぼ消失し、その後 CSA1 は *Pdgfra* と共染する集団として認められ、10 日目には発現が消失した。すなわち、CSA1 は ES 細胞からの心筋細胞分化誘導系においても一過性の発現パターンをとることが確認できた。

#### 5. ES 細胞由来 CSA1 陽性細胞の心筋細胞分化能の解析

そこで、Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)を用いて、CSA1 陽性細胞を収集し、心筋細胞分化能を検討することとした。マウス ES 細胞を心筋細胞へと分化誘導し、その 7 日目に細胞を回収、抗 CSA1 抗体と中胚葉マーカーとしての抗 *Pdgfra* 抗体とで二重染色を行い、FACS にて CSA1 陽性/*Pdgfra* 陽性細胞を収集した。収集された CSA1 陽性細胞を、再び分化誘導メディウムとともに細胞培養ディッシュに播種し、さらに 5 日間培養した。その後、細胞を固定し、心筋トロポニン T (cTnT)に対する蛍光免疫細胞染色とフローサイトメトリーにて、心筋細胞分化能を評価した。その結果、分化誘導 7 日目における CSA1 陽性細胞は、その後ほぼすべてが心筋細胞へと分化することが明らかとなった(図 5)。すなわち、分化誘導 7 日目における CSA1 陽性細胞はすでに心筋細胞系譜にコミットした unipotent な細胞集団であると考えられた。さらに、この細胞集団では、*Nkx2-5*, *Tbx5*, *Isl1*, *Hcn4* が高く発現しており、両心臓領域の心筋前駆細胞であることが示唆された。加えて、抗 CSA1 抗体と抗 *Hcn4* 抗体を用いたフローサイトメトリーを行ったところ、CSA1 陽性細胞では半数強が *Hcn4* 陽性の一次心臓領域前駆細胞であることが明らかとなった。



6. ヒト ES/iPS 細胞心筋細胞分化誘導系における CSA1 の発現解析と表面マーカーとしての有用性

最後に我々は、CSA1 がヒト細胞においても心筋前駆細胞表面マーカーとして有用であるかどうかを確認するため、ヒト ES 細胞の心筋細胞分化誘導系<sup>12</sup>を用いて検討を行った。定量的リアルタイム PCR 解析では、マウス ES 細胞と同様に、心筋細胞が自己拍動を開始する直前である、分化誘導 8 日目において、CSA1 が一過性の発現ピークを持っていることが明らかとなった(図 4)。次に FACS を用いて、心筋分化誘導過程におけるヒト ES 細胞から CSA1 陽性/PDGFRα 陽性の細胞集団を収集し、継続して心筋分化誘導培地中で培養したところ、ほぼすべてが cTnT 陽性でその一部が自己拍動を呈する、心筋細胞へと分化することを確認した。さらに、CSA1 陽性細胞では、マウスと同様に *NKX2-5*, *TBX5*, *ISL1*, *HCN4* が高い発現を示しており、両心臓領域の心筋前駆細胞であることが示唆された。以上の実験により、ヒトの多能性幹細胞を用いた心筋分化誘導系においても、CSA1 が心筋前駆細胞特異的表面マーカーとして有用であることが明らかとなった。

図 4. マウス及びヒト ES 細胞心筋細胞分化誘導系における CSA1 発現

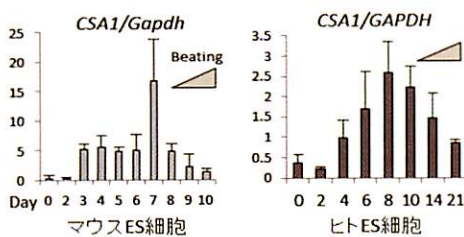
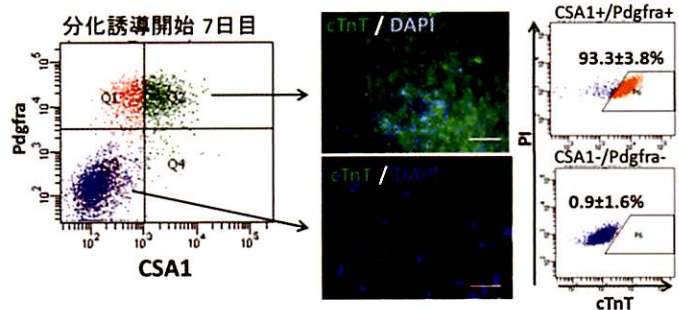


図 5. 心筋前駆細胞に対する FACS と心筋分化能の解析



(結語)

- マウス胚心筋前駆領域由来の single cell cDNA に対する、次世代シーケンサーを用いた網羅的発現解析により、心筋前駆細胞表面マーカー CSA1 が同定された。
- CSA1 はマウス胚において心筋前駆領域に一過性に発現しており、一次/二次心臓領域の両方で発現が認められた。
- ノックアウト実験により、CSA1 はマウスにおいて、心筋細胞分化に重要な役割を果していることが明らかになったが、その下流シグナルは不明であり、今後の検討課題である。
- マウス ES 細胞からの心筋分化誘導系において、CSA1 は心筋前駆細胞表面マーカーとして有用であり、両心臓領域の前駆細胞をマークしていると考えられる。

- ・ ヒト ES 細胞/iPS 細胞からの心筋分化誘導系においても CSA1 は心筋前駆細胞表面マーカーとして有用である。

(参考文献)

(1) Ye et al. Cell Stem Cell. 2014;15:750-61. (2) Tano et al. Mol Ther. 2014;22:1864-71. (3) Sawa et al. Circ J. 2015;79:991-9. (4) Ellison et al. Cell. 2013;154:827-42. (5) Ieda et al. Cell. 2010;142:375-86. (6) Kokkinopoulos et al. submitting data. (7) Kurimoto et al. Nat Protoc. 2007;2:739. (8) Brouillette et al. Dev Dyn. 2012;241:1584-90. (9) Cong et al. Science 2013;339:819-823. (10) Wang et al. Cell 2013;153:910-918. (11) Kattman et al. Cell Stem Cell. 2011;8:228-40. (12) BurrIDGE et al. PLoS One. 2011;6:e18293.

## 教育講演

### ミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV の活性調節因子 Higd1a

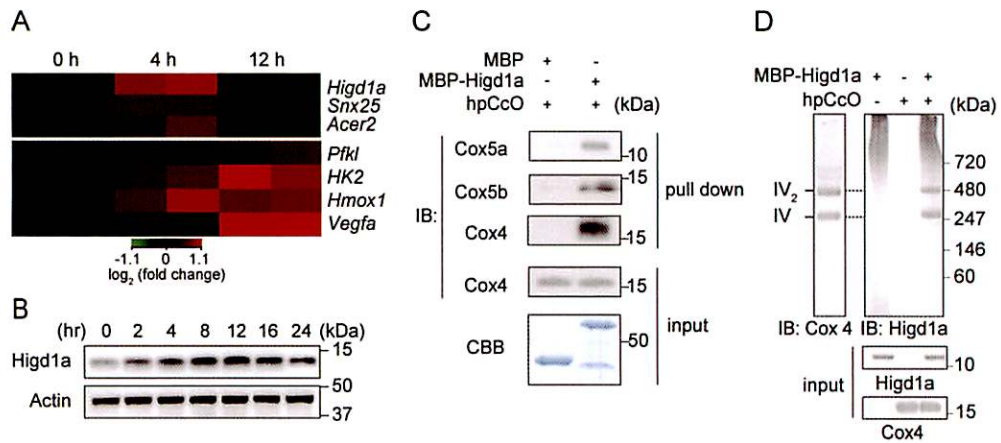
大阪大学大学院医学系研究科 医科学講座 助教  
新谷 泰範

ミトコンドリアの機能異常は、ミトコンドリア病の原因であるばかりでなく、アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患や糖尿病、癌、細胞老化といった多くの病態でもみられ、近年注目されている。ミトコンドリアでは酸素を使った好氣的呼吸により生体のエネルギー源である ATP が産生される。TCA サイクルにて産生された還元電位の高い NADH から、ミトコンドリア内膜の呼吸鎖複合体を介して電子が伝達される間に、膜間スペースへプロトンが汲みだされ、このプロトン濃度勾配を駆動力として最終的に FOF1ATP synthase により ATP が産生される。ミトコンドリアの呼吸鎖複合体など基本的な生化学は解明されているが、ミトコンドリア病の治療法は依然としてエネルギー産生に必要な栄養素やビタミンの補充しかなく、十分といえる状況ではない。

呼吸鎖複合体 IV である Cytochrome c oxidase (CcO; チトクロム C オキシダーゼ)は、13 のサブユニットから構成される巨大タンパク複合体であり、構成分子やアセンブリに関わる分子の変異は Leigh 症候群をはじめとしたミトコンドリア病をひきおこす。呼吸鎖酵素複合体の中で唯一酸素を使う酵素であり、VEGF や EPO の誘導のように酸素分圧による活性調節のメカニズムがあっても不思議ではない。実際に低酸素環境下でミトコンドリアでの ATP 合成効率が上昇することが報告されており、その活性調節メカニズムの存在が示唆されていたが、詳細なメカニズムは明らかにはなっていなかった。

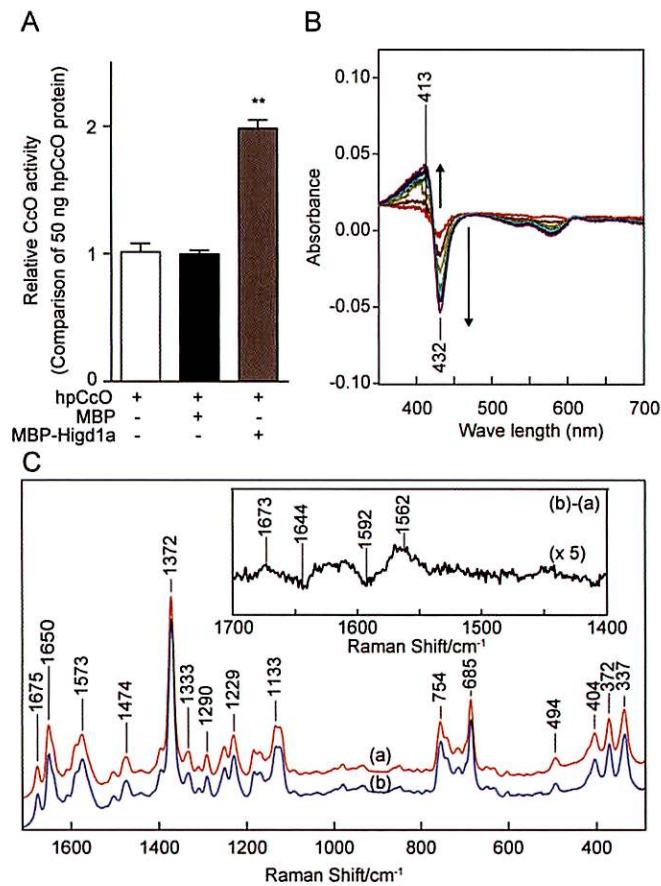
我々のグループでは、ミトコンドリアが豊富に存在する心筋細胞を使って、低酸素環境で早期に転写誘導される遺伝子を cDNA マイクロアレイによりスクリーニングし、CcO の活性制御因子 Higd1a を同定した。in vitro pull-down assay あるいは BlueNATIVE PAGE にて大腸菌で作成したリコンビナント HidD1a の CcO への結合を確認した (図 1)。さらに Higd1a の結合により CcO 活性の上昇を認めた。活性上昇のメカニズムを検討するため、共鳴ラマン分光分析をおこなったところ、CcO と Higd1a の結合により、CcO の活性中心の銅や Heme a<sub>3</sub> ではなく、Heme a の構造変化を認めた (図 2)。

図 1



- A. マイクロアレイを用いた発現解析。上段は低酸素下で早期に誘導される遺伝子。下段は既知の低酸素誘導性遺伝子
- B. Higd1a の低酸素での誘導確認
- C. In vitro pull-down assay にて CcO と Higd1a の結合を確認
- D. BlueNativePAGE にて in vitro で加えた Higd1a が CcO 複合体に integrate することを確認

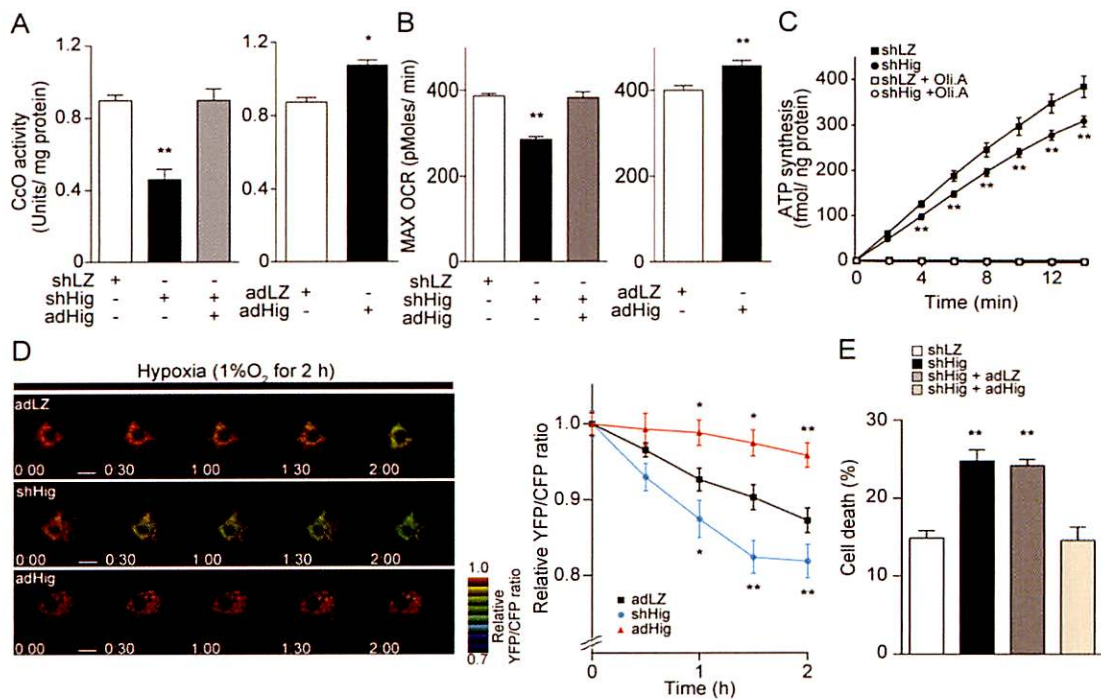
図 2



- A. In vitro CcO 活性の測定。Higd1a の結合により CcO 活性が 2 倍に上昇
- B. CcO の吸収スペクトラム。Higd1a の添加にて 413, 432nm の波長域に吸光度の変化がみられた
- C. 共鳴ラマン分光分析にて (a) CcO 単独に比較し (b) CcO+Higd1a でラマン分散スペクトラムのシフトを認めた

結合シミュレーションにおいても Higd1a は CcO の活性中心の Heme a 近傍に結合しうる  
ことが示唆された。次に細胞におけるミトコンドリア酸化リン酸化(OXPHOS)における  
役割を確かめるために、Fluxalyzer を用いた酸素消費率、セミインタクト細胞を用  
いたミトコンドリア ATP 合成スピードの解析を行ったところ、いずれにおいても Higd1a  
のノックダウンによりミトコンドリア OXPHOS の低下、Higd1a の過剰発現によりその上  
昇を認めた (図 3)。さらにミトコンドリア ATP 濃度をモニターする FRET プローブを用  
いたライブイメージングをもちいて、Higd1a のノックダウンにより低酸素時のさらなる  
ミトコンドリア ATP の低下、過剰発現によるミトコンドリア ATP の保持が認められた  
(図 3)。最後に Leigh 症候群患者細胞に Higd1a を過剰発現させたところ、酸素消費率  
の増加、低酸素における細胞生存の増加を認めた。  
以上より、Higd1a は CcO の新規活性調節分子であること、またミトコンドリア機能不  
全に対する新規治療薬のターゲットとなりうることを示された。

図 3



- A. ラット心筋細胞より細胞抽出液ミトコンドリア分画の CcO 活性測定。Higd1a の knockdown により CcO 活性の低下、過剰発現により活性上昇を確認。
- B. Fluxalyzer を用いた最大呼吸鎖活性の測定
- C. セミインタクト細胞を用いた ATP 合成速度の測定
- D. ミトコンドリア ATP 濃度をモニターする FRET プローブを用いたライブイメージング。  
Higd1a のノックダウンにより低酸素時のさらなるミトコンドリア ATP の低下、過剰発現によるミトコンドリア ATP の保持が認められた。
- E. ラット心筋細胞において低酸素刺激による細胞死 (released LDH) の検討

参考文献 Hayashi T, et al. PNAS 2015;112(5):1553-

*Memo*