

胚性幹細胞(ES細胞)を用いた心筋細胞分化の分子機構の解析

水野 健 彦

①

# 胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いた心筋細胞分化の分子機構の解析

水野 健彦

## 序論

近年、循環器病の臨床は目覚ましい進歩を遂げている。しかし、一方で心筋はいつたん傷害されると再生しないため、心筋梗塞、拡張型心筋症などの心疾患による心機能の低下に対する根本的な治療は存在せず、難治性の心不全の治療は限界に直面しているのが現状である。心筋細胞の分化機構が解明され、心筋細胞の分化誘導が可能になれば、心筋細胞の分化誘導という重症心不全に対しての根本的治療が実現するものと考えらる。したがって、心筋細胞分化の分子機構の解析は生物学的関心に留まらず、臨床的にも強い関心を持たれる。

組織の分化の分子機構に関しては骨格筋で最も詳細に研究されており、組織特異的な転写因子、なかでも MyoD family に属する basic helix-loop-helix factor が重要な役割を果たしていることが明らかになっている<sup>1)</sup>。この MyoD は fibroblast に発現させると fibroblast を myocyte に分化誘導する能力を有しており、筋細胞分化の key factor である。

最近、心筋細胞においても重要な役割を果たす組織特異的転写因子がいくつか単離され、その分化機構の解明が進行している。心筋細胞では MyoD family に属する basic helix-loop-helix factor は単離されておらず、組織特異的転写因子である Csx (Nkx-2.5)<sup>2)</sup>、GATA-4<sup>3)</sup>、MEF-2C<sup>4)</sup> が重要であることが示されている。このうち、Csx は心臓のないショウジョウバエの変異遺伝子 tinman の mouse homolog として 1993 年にクローニングされたホメオボックス遺伝子である<sup>2)3)</sup>。マウス胎仔において cardiac lateral mesoderm に早期から限局して発現すること、ノックアウトマウスでも心臓の発生に異常がみられることなどから、心臓の発生に必須の遺伝子と考えられる<sup>7)</sup>。したがって、Csx の発現調節機構を解析することにより、心筋細胞の分化の分子機構を解明する上で重要な知見が得られることが期待される。そこで本研究では Robbins, J. らにより in vitro で心筋細胞に高率に分化することが報告された胚性幹細胞 (ES 細胞) の系を用い、心筋細胞の分化過程での Csx の promoter 領域の cis element の mapping を行った<sup>8)</sup>。

ES 細胞は mouse 胚の内部細胞塊由来の多分化能有した細胞であるが、浮遊培養を

行くと embryoid body (EB) と呼ばれる細胞集塊を形成する。EB は浮遊培養開始後、5 から 6 日目頃から Csx、GATA-4、MEF-2C などの心筋分化に重要な組織特異的転写因子を発現する。7 日目からは一部が拍動を開始するとともに、 $\alpha$ -myosin heavy chain などの心筋特異的タンパク遺伝子を発現し、最終的には 30 から 50 % の EB が拍動を示す<sup>9)</sup>。このように ES 細胞を用いた心筋分化の系は実際の心臓の発生分化をよく再現している in vitro の系といえる。

Csx の human homolog である CSX は塩島らによりクローニングされた<sup>10) 11)</sup>。その promoter 活性の検討では上流 1 kb の promoter が少なくとも in vitro においては心筋細胞特異的な活性を示すことが明らかになっている。本研究ではこの 1kb の CSX promoter を luciferase に結合した construct を作成し、ES 細胞が心細胞細胞に分化する過程でその活性を検討した。1kb の CSX promoter の転写活性は心筋細胞分化早期に急激に上昇し、Csx の実際の発現の経過と一致していた。そこでこの 1kb の promoter を用い心筋細胞の分化に重要な cis-element の mapping を心筋細胞分化過程の早期の段階と後期の段階とで行った。分化早期にあたる浮遊培養開始後 3 日目と分化の完成した時期に相当する 8 日目の EB に種々の長さの CSX の promoter を luciferase 遺伝子に結合したレポータープラスミドをトランスフェクションし promoter 活性を検討した。さらに同定された重要な cis-element をプローブとしたゲルシフトアッセイを行い結合タンパクを解析した。-700bp から -672bp と -120bp から -100bp の間で luciferase 活性の低下が認められ重要な cis-element が存在するものと考えられた。特に前者は分化の初期段階のみに認められた。その領域の重要な element をゲルシフトアッセイで解析したところ、心筋細胞分化早期に一過性に増加する結合タンパクが検出された。今回、CSX promoter の重要な cis-element とその結合タンパクを同定した。この結合タンパクは心筋細胞分化の早期にのみその cis-element に結合することから心筋細胞の分化誘導に重要な役割を果たす転写因子である可能性が考えられた。

心筋細胞の分化における遺伝子発現調節機構に関して明らかになりつつある一方、心筋細胞分化に関与する細胞内シグナルに関してこれまでほとんど明らかになっていない。



中胚葉誘導に関わるシグナルとしてFGFカエルの中胚葉誘導においてMAP kinase cascade が重要であることが報告されている<sup>(12) (13) (14)</sup>。心臓もまた外側中胚葉から発生する臓器であることから心筋細胞の発生・分化にMAP kinase cascade が関与している可能性を考え、心筋細胞分化におけるMAP kinase cascade の役割をこのES細胞を用いた心筋分化の系で検討した。心筋細胞分化初期に相当する浮遊培養開始後3日目に心臓の発生に必須の組織特異的転写因子CSXの promoterにluciferase遺伝子を結合したレポータープラスミド (CSX-luc) とともにMAP kinase cascade を特異的に阻害あるいは活性化する dominant negative (DN) ras, constitutive active (CA) ras, DN raf1, CA raf1, DN MEK, CA MEK, DN MAPKの発現ベクターをトランスフェクションして、CSXの転写活性を検討し、CSXの転写活性化にMAP kinase cascade が関与していることを明らかにした。MAPK フォスファターゼであるCL100を過剰発現させることにより、MAP kinase cascade を抑制したES細胞では心筋細胞分化が抑制された。また、CL100過剰発現細胞とwild typeとでGATA-4, MEF2-Cの発現を比較検討したところ両者で発現量の違いは認められなかった。これらの結果から、MAP kinase cascadeは心筋細胞分化に必要であり、Csxの転写調節に関与している可能性が示唆された。

#### 方法

**ES細胞の培養** — ES細胞の培養はRobbins, J.らの文献にしたがった<sup>(8)</sup>。ES細胞を未分化状態で維持するためには、mitomycin C (10  $\mu$ g/ml) で処理し、分裂を停止させたマウス胎仔繊維芽細胞上で培養する。mediumはDulbecco's modified Eagles medium (high glucose, without pyruvate, GIBCO BRL) にウシ胎仔血清 20%, non-essential amino acids solution (最終濃度 0.1M, GIBCO BRL),  $\beta$ -mercaptoethanol (Sigma) 7  $\mu$ l/l, LIF (GIBCO BRL, 最終濃度 2000 単位/ml) 添加したものを用いた。mediumは毎日交換し、3から4日毎に播き替えた。ES細胞を分化させるためには細菌培養用シャーレ (イワキ) にES細胞用のmediumからLIFを除いたmediumを入れ、浮遊培養を行った。mediumは毎日交換し、3日ごとに3倍に播き換えを行った。

**RNAの抽出、Northern blot解析** — RNAの抽出はRNAzol B (Cinna Biotex,

Friendwood, TX)を用い、説明書に従っておこなった。サンプル当たり10  $\mu$ g または 20  $\mu$ g のRNA を1.0 % agarose gel で泳動し、nylon membrane (Hybond N, Amasham) にtransfer の後、紫外線固定を行った。hybridization は 1M NaCl, 50mM Tris-HCl (PH 7.5), 1% SDS, 5X Denhardt's solution, 5% Dextran sulfate, salmon sperm DNA 50mg/ml, 40% formamideの溶液中で42℃で行った。probe はcDNA fragment を random hexamer を用い  $^{32}$ P ラベルして用いた。洗浄は 0.1 X SSC, 0.1 %SDS 溶液中42℃の high stringency 条件まで行った。

トランスフェクションと reporter assay — 心筋細胞分化の初期段階を解析するために浮遊培養開始後 2 日後に EB を gelatin コートした培養用ディッシュに移し、EB をディッシュに張り付け、翌 3 日目3.5 cm ディッシュ当たり2.5  $\mu$ gのDNA を用い Chen-Okayama の方法に従ってカルシウムリン酸法により、トランスフェクションを行った<sup>15)</sup>。CO<sub>2</sub> 3%, 37℃の条件で 12 時間培養後に PBS (-) で 2 回洗浄し、medium 交換を行った。更に CO<sub>2</sub> 5% の条件に戻し36 時間培養した 5 日目に PBS (-) で 2 回洗浄の後、細胞溶解液で細胞を溶解、回収し、luciferase 活性をluminometer を用いて測定した。心筋細胞分化の後期の解析の目的では浮遊培養開始後、7 日後の EB を gelatin コートした培養用ディッシュに固定し、翌日トランスフェクションし、以下同様にluciferase 活性を用いて測定した。internal control として、EF- $\beta$ -gal の plasmid を用い各サンプルの  $\beta$ -galactosidase 活性を測定し補正を行った。

核タンパクの抽出 — 核タンパクの調整は Schreiber, E. らの文献にしたがって行った<sup>16)</sup>。EB を medium ごと50ml チューブに移し、1000rpm, 5 分間遠心し、上清を捨てる。PBS (-) で 2 回洗浄の後、10 cm のシャーレ1枚分につき、400  $\mu$ l の Buffer A (10 mM HEPES, 10mM KCl, 100  $\mu$ M EGTA, 1mM DTT, 500  $\mu$ M PMSF, 2  $\mu$ g/ml Aprotinin, 2  $\mu$ g/ml Leupeptin) で懸濁し、4℃で 15 分放置した。25  $\mu$ l の 10% NP-40 溶液を加え vortex で激しく混和の後、4℃で3000 rpm 5 分間遠心し、上清を除いた。Buffer C (20mM HEPES, 0.4M NaCl, 100  $\mu$ M EGTA, 1mM DTT, 1mM PMSF, 2  $\mu$ g/ml Aprotinin, 2  $\mu$ g/ml Leupeptin) 50  $\mu$ l で懸濁し、4℃で30 分間、rotator でゆっくり回転した。4℃で 15000rpm 5 分間遠心し、上清を-80℃で保存

した。

**gel shift assay** — 1 レーン当たり probe  $1\mu\text{l}$  ( $1 \times 10^4$  cpm /  $\mu\text{l}$ ), poly dIdC  $2\mu\text{l}$  ( $2\mu\text{g} / \mu\text{l}$ ), 5X binding buffer  $4\mu\text{l}$  (50mM Hepes-KOH pH 7.8, 5 mM EDTA pH 8.0, 25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 % Glycerol, 25 mM DTT, 3.5 mM PMSF,  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  Aprotinin,  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  Leupeptin,  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  Pepstatin, 5mM sodium orthovanadate), 核抽出液、competitor を加え、計  $20\mu\text{l}$  にし、室温で 30 分間反応させた。5 % acrylamide gel (0.5X TBE)、0.5X TBE 泳動 buffer を用い電気泳動し、gel dryer で乾燥の後、autoradiography を行った。

**CL 100 過剰発現 ES 細胞の cell line の樹立** — CL 100 の cDNA を Bam HI site で pcDNA3 (Invitrogen, CA) にサブクローンし、導入 construct を作成した。ES 細胞を  $3.00 \times 10^6 / 10\text{ cm dish}$  の濃度で播き、翌日 1 デイッシュ当たり  $20\mu\text{g}$  の DNA をカルシウムリン酸法でトランスフェクションした。12 時間後 PBS (-) で 2 回洗浄後、medium 交換しさらに 36 時間培養し、G418 ( $350\mu\text{g}/\text{ml}$ ) で選択を行った。RNA を抽出し CL 100 cDNA を probe として、Northern blot 解析を行い、positive clone を選別した。

**myosin の免疫蛍光染色** — 浮遊培養後 9 日目の EB を gelatin コートした培養用デスライッシュに移した。翌 10 日目には EB がデスライッシュに固定するので、文献 17 に従い、固定染色を行った。PBS (-) で 3 回洗浄し、95 % methanol, 5 % acetate 溶液で  $-20^\circ\text{C}$ , 5 分処理し固定した。wash buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.3, 0.85 % NaCl, 0.1 % Tween) で 2 回洗浄し、さらに、同じ buffer で 15 分室温で放置した。PBS (-) で 2 回洗浄し、1 % ウシ胎仔血清を含む PBS (-) を加え、 $37^\circ\text{C}$  で 60 分間 blocking を行った。MF 20 の 1 次抗体反応を  $37^\circ\text{C}$  で 60 分間行った。PBS (-) で 5 回洗浄し、10 % ウシ胎仔血清を含む PBS (-) で 300 倍に希釈した FITC 抗マウス IgG (Amasham, England) を加え、 $37^\circ\text{C}$  で 60 分間反応させた。PBS (-) で 5 回洗浄後、gel mount し、蛍光顕微鏡で観察した。さらに写真上 染色された領域の面積を測定し、wild type と CL 100 過剰発現 ES 細胞の cell line での myosin の発現を比較検討した。

## 結果

### ES 細胞分化の系における組織特異的転写因子発現の時間経過

ES細胞はマウス胚の内部細胞塊由来の多分化能を有した細胞である。ES細胞はフィーダーレイヤー上で培養すると未分化能を保ち続けるが、フィーダーレイヤーなしで、浮遊培養を行うと、embryoid body (EB) と呼ばれる細胞集塊を形成し、心筋細胞に分化することが報告されている<sup>8)</sup>。本研究ではこのES細胞が心筋細胞に分化する過程で心筋細胞の分化に重要と考えられる組織特異的転写因子 GATA-4, MEF-2 (A-D) の発現の時間経過を Northern blot 法で検討した。GATA-4, MEF-2A, MEF-2C の発現が心筋分化の早期に相当する浮遊培養開始後 6 日目から認められた。MEF-2B の発現は検出されなかった。MEF-2A の発現が 6 日目から始まり 10 日目にさらに増加を示したのに対し、MEF-2C は 6 日目から急激に発現していた。(Fig.1)

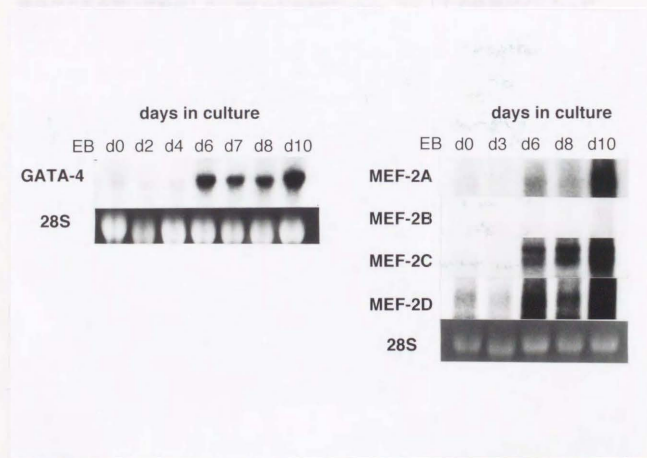




Fig. 1 ES細胞分化の系における GATA-4, MEF-2 (A-D) の発現の時間経過

ES細胞を浮遊培養し心筋細胞に分化させる過程で、経時的にEBを回収し、RNAを抽出した。1レーン当たり20  $\mu$ gのtotal RNAを用い、high stringency conditionでhybridizationを行った。probeはGATA-4はfull length cDNAを用いた。MEF-2 (A,B,C,D) については isoform間での cross hybridization を避けるため、配列の相同性の高い MEF-2 box, MADS box を含まない領域を用いた。MEF-2A (nucleotides 2158-2322), MEF-2B (502-1500), MEF-2C (1047-1645), MEF-2D (1104-1639)。

## II) 心筋細胞の分化過程におけるCSX promoterの cis-element の mapping

### 1) 心筋細胞分化の過程でのCSX promoterの活性化の時間経過

CSXの上流1 kbのpromoterはin vitroにおいて心筋特異的な活性を示すことが明らかになっている。そこで発生・分化の過程におけるこの1 kbのpromoterの活性をES細胞分化の系を用いて検討した。EBを経時的にgelatinコートした培養ディッシュに固定し、CSXの上流1 kbのpromoterをluciferase遺伝子に結合したプラスミドCSX (-1000) luc をリン酸カルシウム法でトランスフェクションした。36時間後にluciferase活性を検討した。luciferaseの活性は浮遊培養開始後3から5日の間に急激に上昇し、その後高値を保った。この結果は実際のCsxのmRNAの発現の時間経過とよく一致する。

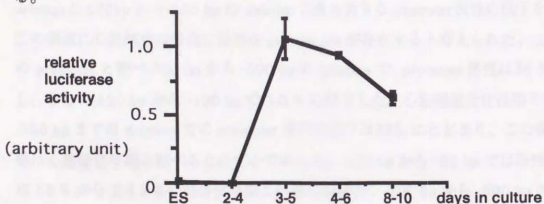


Fig.2 心筋細胞分化の過程でのCSX promoterの活性化の時間経過

CSXの1 kbのpromoter活性は浮遊培養開始後3から5日という心筋細胞分化早期に急激に上

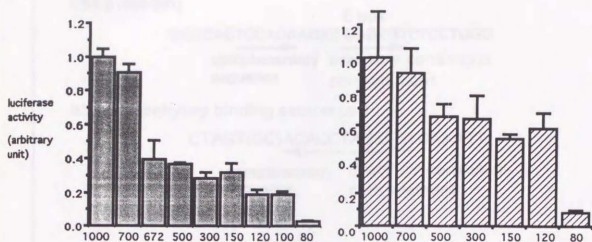
昇しており、実際の遺伝子発現の経過と一致している。

## 2) 心筋細胞の分化の過程における CSX promoter活性の promoter deletion constructs を用いた解析

CSX 上流 1 kb の promoter活性が心筋細胞の分化に伴って、上昇することから心筋細胞の分化に関わる重要な cis-element が存在することが予想される。そこで promoter deletion constructs を用い心筋細胞の分化過程の早期と後期とで cis-element の mapping を行い、分化に重要な領域を検討した。心筋細胞分化早期の検討のため EB を浮遊培養開始後2日目にgelatinコート培養ディッシュに固定し、3日目に CSX の promoter deletion constructsのトランスフェクションをおこない、5日目に assay を行った。3日目から5日目というCsx,GATA-4,MEF-2 familyなどの心筋細胞の分化に必要な組織特異的転写因子の発現の直前の時期のCSX promoter活性を検討した。また、心筋細胞分化の後期段階を検討するため、心筋細胞構造タンパクが発現し、自発拍動を始めた時期である8日目にトランスフェクションをおこない、10日目に assay を行った。

Fig.3 にまとめたように心筋細胞分化早期の検討では -700 bp から -500 bp の deletionと-120bp から-100 bp の deletionで最も大きな promoter活性の低下を認め、この領域に心筋細胞の分化に重要な cis-element が存在すると考えられた。-1000 bp の promoter と比べ-700 bp から -500 bp の deletion で promoter 活性は36 %に低下し、さらに-120 bp から -100 bp で 3.0 %に低下した。心筋細胞分化後期の検討では、-500 bp までの deletion での promoter 活性の低下は65%にとどまり、この領域の影響は心筋分化早期と較べるとわずかであった。-120 bp から -80 bp では活性の低下は 58 % から 8.4 %と心筋分化早期と同様に認めた。-700 bp から -500 bp の deletion での promoter 活性は心筋細胞分化早期の段階のみであったのでこの領域に心筋細胞の分化に重要な cis-element が存在する可能性が考えられた。この領域に存在する既知の motif を検索したところ、E box 及び中胚葉誘導の際最も早期に発現し、notochord の分化に必須の転写因子 Brachyuryのbinding consensus sequence 中のcore

element が存在していた<sup>18) 19)</sup>。そこでこの領域 (-668 bp から -691 bp) を削った -672 bp までの deletion construct を作成し、検討したところ、-1000 bp の promoter と較べて 39% に活性が低下しており、-700bp から -672bp の領域の重要性が示唆された。(Fig.3A,B)



A. 心筋分化早期 (浮遊培養開始3日から5日) B. 後期 (浮遊培養開始8日から10日)

Fig. 3 心筋細胞の分化の過程における CSX promoter活性の promoter deletion constructs を用いた解析

心筋細胞分化早期では -700 bp と -672 bp の間と -120 bp と -100 bp の間の領域で luciferase 活性の低下が認められたのに対し、心筋細胞分化後期では前者の低下はわずかであった。

### 3) -700bp から -672bp 領域の gel shift assay による解析

Brachyury の binding sequence は 1993 年 Kispert, A. らに報告され、20bp からなる palindrome である<sup>18)</sup>。今回の検討で心筋細胞分化の早期に重要と考えた -700 bp から -672 bp 領域は Brachyury の binding sequence のうち 6 bp の core-element とその complementary sequence を 4 bp の spacer をおいて含んでいた (Fig. 4)。Brachyury による転写活性化には palindrome でなくても half site が同方向に存在していたり、spacer をおいて存在していたりしてもよく、CSX の -668 bp と -691bp にある site

にBracyury が結合する可能性があると考えられた。一方、E box も存在することから、E box が重要である可能性も考えられた。そこでこの領域の cis-element を gel shift assay を用いて解析した。

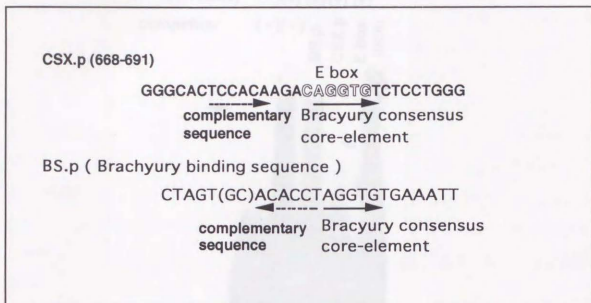


Fig. 4 CSX promoter の -668 bp と -691 bp の間の sequence とその領域に存在する motif

CSX promoter の -668 bp と -691 bp の間の sequence に実際に結合するタンパクが存在するかどうか検討するためこの領域の sequence を probe (CSX.p) として、浮遊培養 5 日目の EB から核タンパクを抽出し、gel shift assay を行ったところ、CSX.p に対する結合タンパクが確認された。この結合タンパクは muscle creatinine kinase (MCK) の E box では競合されないが、CSX.p で競合されるため、特異的結合タンパクであり、Brachyury の binding consensus sequence (BS.p) では競合されないことから Brachyury ではないと考えられた。(Fig. 5)

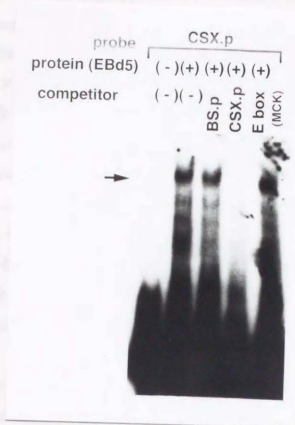


Fig. 5 CSX.p に対する EB (day 5) 核タンパクの結合

CSX.p を probe として gel shift を行ったところ、CSX.p に結合する特異的タンパクが検出されたが、これは BS.p (Brachyury binding consensus sequence) では競合せず、Brachyury ではないと考えられる。

次に、この結合タンパクの発現の時間経過を検討するために ES 細胞、及び浮遊培養 5 日目と 10 日目の EB から核タンパクを抽出し、CSX.p を probe にして gel shift assay を行った。結合タンパクは ES 細胞ではごくわずかに認めるだけであったが、5 日目には急激に増加し 10 日目には消失していた。この結合タンパクの発現経過は前述の CSX の promoter 活性の検討でこの領域が浮遊培養開始後 3 日目から 5 日目という心筋細胞分化の早期でのみ重要であり、心筋細胞分化の後期では重要でないという結果とよく一致する (Fig. 6 A)。この事実はこの結合タンパクがこの領域に実際に結合して promoter を活性化していることを示唆しており、心筋細胞の分化誘導に重要な役割を果たしている因子である可能性が考えられた。



この結合タンパクと Brachyury の関係をさらに検討するため、cos 細胞に Xenopus Brachyury (Xbra) の発現ベクターをトランスフェクションし核タンパクを抽出して検討した。Xbra はその binding sequence である BS.p に結合したが、浮遊培養 5 日目の EB 核タンパクはごく弱い結合しか示さなかった。CSX.p と 浮遊培養 5 日目の EB 核タンパクの結合した band は Xbra と BS.p の band とほぼ同じ位置でありこの結合タンパクは Brachyury と分子量が近いものと考えられた (Fig. 6 B)。

そこで先とは逆に Xbra が この CSX.p に結合するかどうかを検討した。Xbra が BS.p に結合し、BS.p で競合されるが、CSX.p で競合されないのに対し、この結合タンパクは Xbra を発現させない cos 細胞ですでに発現しており、CSX.p で競合され、BS.p で競合されないという反対のパターンを示しており、競合の特性からは Xbra は CSX.p には結合しないものと考えられた (Fig. 6C)。これらの結果から、CSX.p 結合タンパクは Brachyury ではないこと、また Brachyury は CSX.p に結合しないことが結論される。

次に CSX.p 中の重要な配列を決定するため、E box (CSX.p-m1) と Brachyury の binding consensus sequence の core-element を含む配列に (CSX.p-m2) それぞれ mutation を導入した probe を用いて検討したところ、E box に mutation を導入すると binding affinity を失うことが明らかになった。これに対し、CSX.p-m2 は binding affinity を保っており、E box に導入した mutation がより重要であったと考えられた。

CSX promoter の転写活性の解析で心筋細胞分化早期の段階において特異的に重要な領域が明らかになった。さらに gel shift assay で心筋細胞分化早期にのみこの領域に結合するタンパクが同定された。この領域は E box を含み、さらに Brachyury の binding sequence のうち 6bp の core-element とその complementary sequence を 4 bp の spacer をおいて含んでいたが、後者の motif は重要でないことが示され、E box の重要性が示唆されたが、これが本当に E box であるのか、新たな motif であるのかはさらに詳細な検討を要すると思われる。

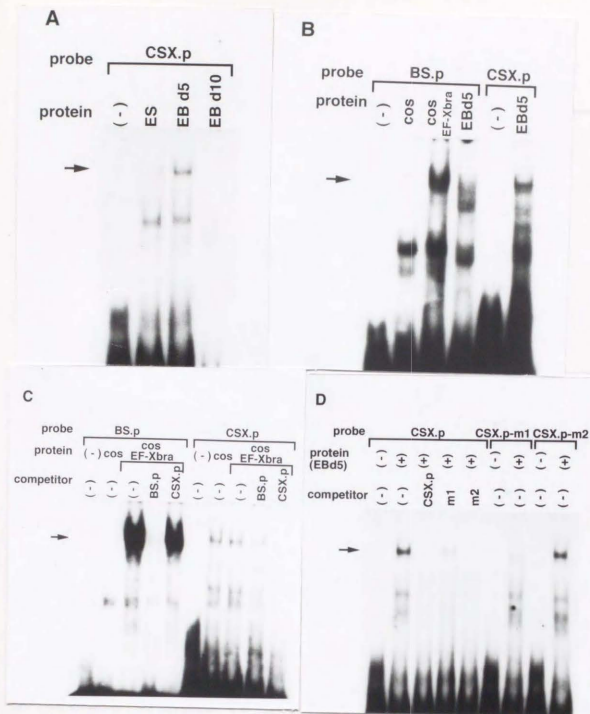


Fig. 6 A,B,C,D CSX.p 結合タンパクの gel shift assay による解析  
 (A) ES細胞の分化の過程におけるCSX.p 結合タンパクの発現の時間経過。ES細胞の段階でわずかだが、浮遊培養5日目で増加し、10日目には消失した。(B) Brachyury binding sequence(BS.p)に対する結合。cos細胞に発現させたXbraは結合するが、EB day5の核タンパクは結合しない。(C) XbraのBS.pとCSX.pに対するbinding affinity BS.pには結合するが、CSX.pには結合しない。(D) CSX.pにおける重要なcis-element のmutation による検討。m1のmutationによりbinding affinityが低下する。

E

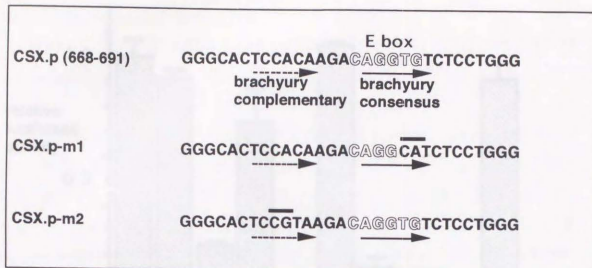
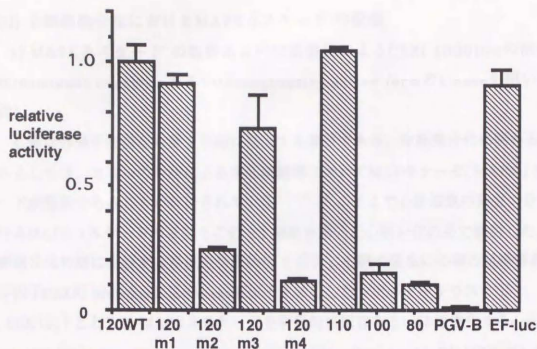


Fig. 6 E CSX.p 結合タンパクの gel shift assay による解析 gel shift のprobe ( wild type と mutation 導入probe ) のsequence

#### 4) 心筋細胞の分化の過程における CSX の proximal promoter の point mutation constructs を用いた解析

CSX promoter の deletion analysis で -120bp から -100bp の間で 心筋細胞の分化早期と後期共通に最も顕著な promoter 活性の低下を認め、この領域に重要な cis-element が存在するものと考えられた。この領域には E box-like motif と GC-rich element あり、mutation を加えて検討した。E box-like motif へ mutation を導入しても活性は 91 % とほとんど低下せず、E box として機能していないことが明らかになった。一方、GC-rich element への mutation では活性は 24 % にまで低下するが、この両者同時に mutation を導入すると活性は 12 % になり、両者は協調的に作用していることが示された。また -120bp から -100bp の間には E box-like な配列と GC-rich な配列があり、point mutation による検討ではその両者とも重要であることが示された。



E box-like	GC-rich	relative luc.act.
CSX(-120WT)	CCTTCCAAAATGCGTCGTCGTTGGTGGCCCCCTTTAAAAAAGCTGGG	100
CSX(-120m1)	CC	91
CSX(-120m2)	AA	24
CSX(-120m3)	GA	73
CSX(-120m4)	CC	12
CSX(-110)	CGTCGTCGTTGGTGGCCCCCTTTAAAAAAGCTGGG	104
CSX(-100)	CCCCTTTAAAAAAGCTGGG	15

Fig. 7 心筋細胞の分化の過程における CSX の proximal promoter (-120bp から -80bp) の point mutation constructs を用いた解析

-120bp から -100bp の間で promoter 活性の著明な低下を認め、この領域に重要な cis-element が存在するものと考えられた。この領域には E box-like motif と GC-rich element があり、mutation を加えて検討した。E box-like motif へ mutation を導入しても活性は 91% とほとんど低下せず、E box として機能していないことが明らかになった。一方、GC-rich element への mutation では活性は 24% にまで低下するが、この両者同時に mutation を導入すると活性は 12% になり、両者は協調的に作用していることが示された。

### III) 心筋細胞分化におけるMAPKカスケードの役割

1) MAPKカスケードの阻害あるいは活性化によるCSX(-1000)lucの活性の変化(dominant negative あるいはconstitutive active formのkinaseを用いた検討)

心臓は外側中胚葉から最も早期に発生する臓器である。中胚葉分化に関わるシグナルとしては、カエルのFGFによる中胚葉誘導においてMAPキナーゼ(MAPK)カスケードが重要であることが報告されている<sup>12) 13) 14)</sup>。そこで心筋細胞の発生・分化におけるMAPKカスケードの役割をこのES細胞を用いた心筋分化の系で検討した。心筋細胞分化初期に相当する浮遊培養開始後3日目に心臓の発生に必須の組織特異的転写因子CSXのpromoterにluciferase遺伝子を結合したレポータープラスミド(CSX-luc)とともにMAPKカスケードを特異的に阻害あるいは活性化するdominant negative (DN) ras, constitutive active (CA) ras, DN raf1, CA raf1, DN MEK, CA MEK, DN MAPKの発現ベクターをトランスフェクションし、CSXの転写活性に与える影響を検討した。CSX-lucの活性はDN rasで4%とほとんど完全に抑制され、CA rasにより、4倍に上昇した。raf, MEKK, MAPKにおいてもdominant negative formでCSX-lucの活性を抑制し、constitutive active formで活性を亢進させていたが、rasと比較その効果は部分的であった。rasの下流にはraf1の他PI-3 kinaseなどもあり、DN rasの強力なCSXの転写活性抑制はraf1以外にもこれらすべてのシグナルを抑制するためであるとも考えられるが、一方DN rasは転写全般を非特異的に抑制することが知られており、CSXの転写活性抑制に非特異的な転写抑制の間接的影響も関与している可能性も考えられた。raf1より下流のMAP kinase cascadeの阻害でもCSXの転写活性抑制は抑制され、PI-3 kinaseでなくMAP kinase cascadeがCSXの転写調節に関与している可能性が示唆され、心筋細胞の分化にも重要な細胞内シグナルであると考えられた。



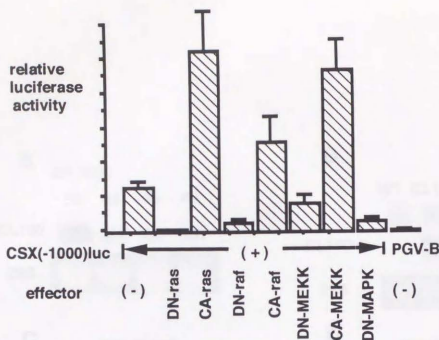


Fig. 8 MAPKカスケードの阻害あるいは活性化によるCSX(-1000) lucの活性の変化 (dominant negativeあるいはconstitutive active formのkinaseを用いた検討)

2) MAP-kinase phosphatase CL100 overexpression cell line を用いた検討  
 さらに、MAP kinase cascadeの分化時の役割を解析するため、MAP kinase活性をnegativeに調節するMAP-kinase phosphatase CL100のES細胞の分化過程における発現を検討した。CL100はES細胞では豊富に発現しているが、分化とともにその発現量が減少する(Fig.9A)。このことからES細胞ではCL100が豊富に発現し分化を抑制しているが、CL100の発現の減少に伴い心筋分化が進行する可能性が考えられた。そこで、CL100を過剰発現ES細胞のcell lineを単離し、検討した(Fig.9B)。

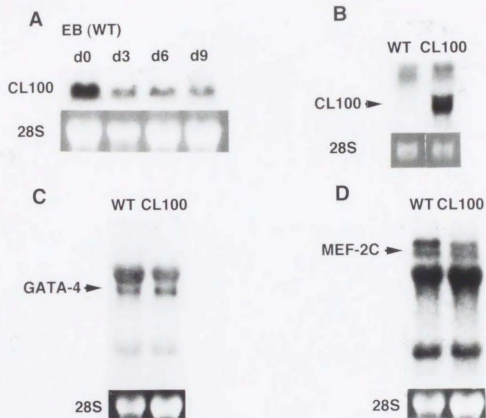
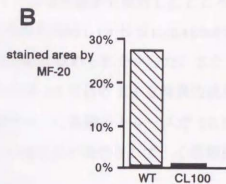
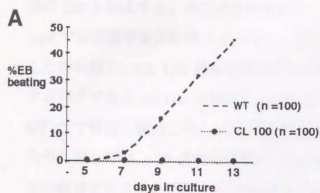
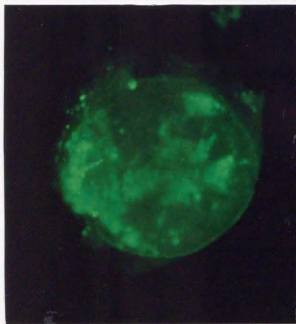


Fig. 9 MAP-kinase phosphatase CL100 overexpression cell line を用いた検討

A. ES細胞分化の系における CL 100 の発現の時間経過 B. CL 100 過剰発現 ES 細胞株のクローニング wild type 及び CL 100 過剰発現 ES 細胞株を用いた心筋細胞分化時の GATA-4 (C.) と MEF-2C (D.) の発現の Northern blot 法による解析。各レーンには  $10 \mu\text{g}$  の total RNA をのせた。GATA-4 cDNA full length を MEF-2C は isoform に特異的な probe (nucleotide 1047-1645) を用いた。

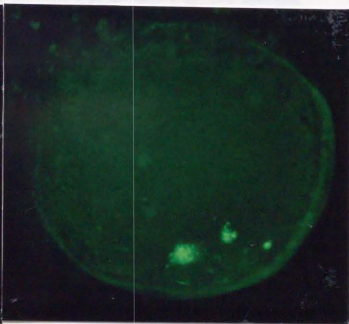


**C**



wild type (EB d 10)

**D**



CL100 overexpression (EB d 10)

Fig. 10 wild type ES 細胞 と CL 100 過剰発現 ES 細胞の分化時の自発拍動率 ( A ) と myosin の発現 ( B, C, D )

wild type ES 細胞 と CL 100 過剰発現 ES 細胞 を分化させると、形態的にはほぼ同様の EB を形成する。そこでそれぞれの EB の自発拍動率を検討したところ、wild type では浮遊培養開始後 7 日目から一部が拍動を開始し 13 日目には 46% が拍動を示したのに対し、CL 100 過剰発現株では自発拍動は認められなかった。また 心筋構造タンパクである myosin の発現を浮遊培養開始後 10 日目の EB を特異的抗体である MF20 で染色し検討した。wild type では 染色された面積のトレースで 26 % であったのに対して CL 100 過剰発現株では 0.8 % とほとんど染色されず、心筋細胞への分化が阻害されることが明らかになった( Fig.10 )。

心筋細胞分化の阻害の機序を明らかにするため、wild type ES 細胞 と CL 100 過剰発現 ES 細胞 において心筋細胞分化に重要な組織特異的転写因子である GATA-4、MEF-2C の発現を Northern blot 法で検討したところ、GATA-4 および、MEF-2C の発現には変化がなかった( Fig.9 C, D )。また、wild type ES 細胞 と CL 100 過剰発現 ES 細胞 を浮遊培養で分化させ、CSX promoter の転写活性を比較検討した。浮遊培養開始後、3 日目に 1kb の CSX promoter を含む luciferase vector を遺伝子導入し、5 日目に luciferase 活性を測定した。wild type では CSX の promoter 活性の上昇を認めたのに対し CL 100 過剰発現細胞では CSX の promoter 活性の上昇を認めなかった( Fig. 11 )。CSX の promoter 活性化に MAP kinase のリン酸化が必要であることが示唆された。

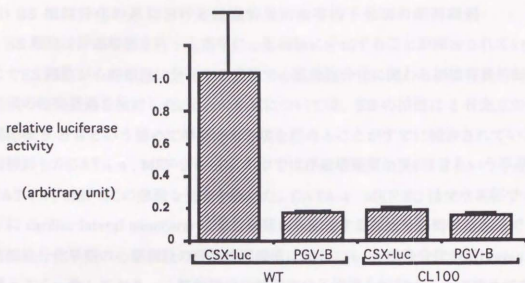


Fig. 11 wild type ES 細胞 と CL 100 過剰発現 ES 細胞の分化時の CSX の転写活性の比較検討

wild type ES 細胞 と CL 100 過剰発現 ES 細胞を浮遊培養で分化させ、浮遊培養開始後、3 日目に 1kb の CSX promoter を含む luciferase vector を遺伝子導入し、5 日目に luciferase 活性を測定した。CL 100 過剰発現細胞では luciferase 活性の上昇を認めなかった。



## 考察

### I) ES 細胞分化の系における組織特異的転写因子発現の時間経過

ES 細胞は浮遊培養を行うと高率に心筋細胞に分化することが報告されている<sup>8)</sup>。そこでES 細胞が心筋細胞に分化する過程で心筋細胞分化に関わる組織特異的転写因子の発現の時間経過を検討した。Csxの発現については、EBの拍動に2日先立つ浮遊培養開始後5日目という極めて早期から発現を認めることがすでに報告されている<sup>2)</sup>。今回検討したGATA-4、MEF-2 familyの中では浮遊培養開始後6日目という早期にGATA-4、MEF-2Cの急激な発現を認めた。GATA-4、MEF-2Cはマウス胚でCsxとともにcardiac lateral mesodermに最も早期から発現する組織特異的転写因子であり、心筋細胞分化早期の心筋細胞の分化誘導機構に関してもES細胞分化の系はvivoの分化過程とよく一致しており、心筋細胞分化誘導の分子機構を検討する上で極めて有用な系と考えられた。

### II) 心筋細胞の分化段階におけるCSX promoterの cis-element の mapping

組織分化の分子機構を解明するためには組織特異的な分子の発現調節機構を検討することは極めて有用な手段である。tinmanは心臓のないDrosophila変異株から単離されたホメオボックス遺伝子である。Csxはtinmanのmouse homologとしてクローニングされたマウスホメオボックス遺伝子であり、心筋分化の最早期から、cardiac lateral mesodermに高度に限局した発現パターンを示す<sup>2) 3)</sup>。またknock out mouseは心臓の発生の極めて早期にあたるlooping stageの異常により胎生8.25日から8.5日で死亡する。これらのことからCsxは心臓の分化に必須の転写因子と考えられる<sup>7)</sup>。最近、私たちの研究室の塩島らによりCsxのhuman homolog (CSX) がクローニングされた<sup>10)</sup>。マウスCsxとヒトCSXはアミノ酸レベルで100%、核酸レベルで93%と極めて高い相同性を示し、相同遺伝子である。心筋細胞分化の分子機構、特に心筋分化誘導といった最早期の現象を解明する上で、CSX promoterの解析により極めて有用な知見を得られることが期待される。

ES細胞を用いた検討で、-700 bp から-672 bp 領域と-120 bp から-100 bp に重要なcis-elementが存在することが明らかになった。前者は心筋細胞分化の早期におい

でのみ重要であり、分化誘導に関わる cis-element であることが示唆された。この -700 bp から -672 bp 領域の検討で 中胚葉形成の際に最も早期に発現する転写因子 Brachyury の binding consensus sequence の core element を含む配列と E box が存在した。gel shift assay の結果では E box の mutation で binding affinity が著しく低下するので E box が重要である可能性が疑われたが、これが E box であるのか、あるいは未知の motif であるのかさらに検討を要する。

この領域に結合するタンパクは心筋分化早期に出現し、その後消失するという非常に興味深い発現パターンを示したことから心筋細胞分化に関わる転写因子である可能性が考えられる。これまでに心臓の発生分化に重要である可能性が報告された basic helix-loop-helix (bHLH) type の転写因子としては twist、dHAND、eHAND が挙げられる<sup>20) 21)</sup>。

Drosophila においては中胚葉分化に重要な bHLH protein である twist が tinman の上流の因子であることが明らかになっている。しかし、twist の mouse homolog である M-twist がマウスにおいては予定心臓領域に発現していないこと、M-twist の knock out mouse で心臓に異常を認めないことなどから、Csx の転写調節に M-twist が関わっている可能性は否定的と考えられた<sup>20)</sup>。また今回用いた ES 細胞の系で M-twist を発現させても CSX promoter の転写活性に変化を認めなかった(data not shown)。eHAND は最近、Cserjesi, P. らにより E12 と結合するタンパクとして yeast の two hybrid system を用いクローニングされた bHLH protein である。また dHAND は eHAND を用いた low-stringency hybridization でクローニングされた bHLH protein である。両者ともに心臓の原器から発現し、心筋分化に重要であることが示唆されている。eHAND の発現が Csx knock out mouse では認められないことから、eHAND は Csx により発現調節を受けている可能性が考えられる。今回の結合タンパクは Csx の発現に先だって発現しており Csx の転写調節に関わる未知の転写因子である可能性があると思われる。今後、様々な E box の motif を用いた競合実験などを行い、この結合タンパクの性質をさらに明らかにする必要がある。

現在、CSX promoter を Lac Z 遺伝子に結合した transgene を用いた transgenic mouse を

作成中であり、in vivoのpromoterの解析によって、さらに正確な転写調節機構を明らかにしようと試みている。

一方、Csxの果たす機能についても、in vivoでの解析を進めている。ショウジョウバエのtinmanとそのmouse homologであるCsxとはそのhomeodomainのアミノ酸配列は72%の相同性を有している。しかしショウジョウバエのtinman mutantでは全く、心臓が形成されないが、Csxの knock out mouseでは心臓の発生がlooping stageまでは進行し、MLC-2V以外の心筋特異的構造タンパクは正常に発現する点が異なっている。最近、脊椎動物においては複数のfamily遺伝子がtinman homologとして機能している可能性が示唆された。XenopusではCsx/Nkx-2.5のhomologであるXNkx-2.5の他、XNkx-2.3がクローニングされており、いずれの過剰発現によっても心筋のhyperplasiaを来すことが報告されている。このように脊椎動物では複数のfamily遺伝子がredundantな機能を果たし、より複雑な調節を行っている可能性が考えられる。現在、Csxの過剰発現transgenic mouseや、dominant negativeの手法によりCsxの機能をstage specificに抑制したtransgenic mouseを作成しており、これらの解析を通じてCsxの機能の詳細な検討を進める予定である。

### III) 心筋細胞分化におけるMAPKカスケードの役割

Xenopus においては中胚葉誘導は FGF に依存し、Ras, Raf を必要としていることが報告されている<sup>12) 13)</sup>。Rasを介するシグナルとしてはRafを介する経路の他、PI-3 kinaseの経路がある。Umbauer, M.らはXenopusのanimal capにおける中胚葉誘導でMAP kinaseが重要であることを報告した。すなわち、MEKやMAP kinaseの過剰発現がFGFと同様に腹側中胚葉を誘導すること、反対にMAP kinase-specific phosphatase X17Cの過剰発現でFGFによる腹側中胚葉の誘導が阻害されることを示した。これらの結果からXenopusの中胚葉誘導にはPI-3 kinaseやp70S6 kinaseでなくMAP kinaseが重要であると報告した<sup>14)</sup>。また最近、ショウジョウバエにおいてFGF receptor homologであるheartlessのmutantがcardiac mesoderm, visceral mesoderm, dorsal somatic muscleの異常によりembryonic lethalであることが報告された<sup>22) 23)</sup>。このことから

心臓の発生におけるMAP kinase cascadeの役割は重要な検討課題である。

本研究ではES細胞分化の系を用い心筋細胞分化におけるMAP kinase cascadeの役割を検討した。MAP kinase phosphatase CL100を過剰発現させたES細胞では、心筋細胞への分化は著しく阻害され、自発拍動を示すEBを認めなかった。またMF20による染色ではmyosinの発現をほとんどに認めなかった。この様に、心筋細胞分化においてMAP kinase cascadeが必須のシグナルであることが示唆された。dominant negativeあるいはconstitutive active formのras, raf1, MEKK, MAP kinaseを用いCSX promoterの活性を検討した実験ではdominant negative formでCSX promoterの活性が抑制され、またconstitutive active formでCSX promoterの活性を亢進させた。また、CL100を過剰発現させたES細胞では分化に伴いCSX promoterの活性がほとんど上昇しなかった。これらの結果から、MAP kinase cascadeがCSX promoterの活性化に関与していることが考えられた。一方、GATA-4, MEF2-Cの発現量をNorthern blotで検討したところ、wild typeとCL100を過剰発現細胞で差を認めなかった。

ショウジョウバエでは中胚葉原器が背側外胚葉の下に陥入し、背側外胚葉からの液性因子の影響を受けcardiac mesoderm, visceral mesoderm, dorsal somatic muscleに分化する。FGF receptor homologであるheartlessのmutantではこの中胚葉原器の移動が正常になされず、このためcardiac mesoderm, visceral mesoderm, dorsal somatic muscleの分化異常が起こるが、この中胚葉原器の移動に必要なシグナルの一部がras1を介していることが報告されている<sup>2,21,23)</sup>。また一方で、chickenのexplantではBMP-2, FGF-4の両者を同時に添加すると、心筋細胞の分化が誘導されることが報告されている<sup>24)</sup>。これらの報告からFGFが心筋細胞分化に関係していることが示唆され、それが中胚葉原器の移動に必要である可能性と、心筋分化に直接関与する可能性が考えられる。またFGFのシグナルとしてはMAP kinase cascadeが重要であり、実際ショウジョウバエではras1の関与が示唆されている。in vitroの系を用いた本研究の結果から心筋細胞分化にMAP kinase cascadeが必要であり、CSX promoterの活性化に関与している可能性が示唆された。MAP kinase cascadeがどのような機序でCSX promoterの活性化など心筋細胞分化に関わっているのか検討を要するものと考えられる。



## Reference

- 1) Rudnicki, M.A., Schlegelsberg P. N. J., Stead, R.H., Braun, T., Arnold, H-H., and Jaenisch, R., 1993. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell*, 75:1351-1359.
- 2) Komuro, I., and Izumo S. 1993. Csx: a murine homeobox containing gene specifically expressed in the developing heart. *Proc. Natl. Sci. USA* 90: 8145-8149.
- 3) Lints, T. J., Parsons L. M., Hartley L, Lyons, I. and Harvey, R.P. 1993. Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development* 119:419-431.
- 4) Grepin, C., Robitaille, L., Antakly, T., and Nemer, M., 1995. Inhibition of transcription factor GATA-4 blocks in vitro cardiac muscle differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, 15: 4095-4102
- 5) Edmondson, D.G., Lyons, G.E., Martin, J.F., and Ohlson, E. 1994. Mef2 gene expression marks the cardiac and skeletal muscle lineages during mouse embryogenesis. *Development*, 120: 1251-1263.
- 6) Bodmer, R., Jan, L.Y., and Jan Y.N. 1990. A new homeobox-containing gene, msh-2, is transiently expressed early during mesoderm formation in *Drosophila*. *Development* 110:661-669
- 7) Lyons, J., Parsons, L.M., Hartley, L., Li, R., Andrews, J.E., Robb, L., and Harvey, R.P. 1995. Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx-2.5. *Genes and Dev.* 9: 1654-1666
- 8) Robbins, J., Gulick, J., Sanchez, A., Howles, P., and Doetschman, T., 1990. Mouse embryonic stem cells express the cardiac myosin heavy chain genes during development in vitro. *J. Biol. Chem.* 265 (20): 11905-11909
- 9) Miller-Hance, W. C., LaCorbiere, M., Fuller, S. J., and Evans, S. E., Lyons, G., Schmidt, C., Robbins, J., and Chien, K. R. 1993. In vitro chamber specification during embryonic stem cell cardiogenesis. *J. Biol. Chem.* 268(33): 25244- 25252



- 10) Shiojima, I., Komuro, I., Mizuno, T., Ryuichi, A., Akazawa, H., Oka, T., Yamazaki, T., and Yazaki, Y., 1996. Molecular cloning and characterization of human cardiac specific homeobox gene CSX1. *Circ Res.*, 79(5): 920-929
- 11) Shiojima, I., Komuro, I., Inazawa, J., Nakahori, Y., Matsushita, I., Abe, T., Nagai, R., and Yazaki, Y. 1995. Assignment of cardiac homeobox gene CSX to human chromosome 5q34, *Genomics*, 27(1) 204-206
- 12) Amaya, E., Musci, T.J., and Kirschner, M.W. 1991. Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Cell*, 66:257-270
- 13) Amaya, E., Musci, T.J., and Kirschner, M.W. 1993. FGF signaling in the early specification of mesoderm in *Xenopus*. *Development*, 118:477-487
- 14) Umbhagauer, M., Marshall, C.J., Mason, C.S., Old, R.W., and Smith, J.C. 1995. Mesoderm induction in *Xenopus* caused by activation of MAP kinase. *Nature*, 376(6): 58-62
- 15) Chen, C., and Okayama, H. 1987. High efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.*, 7: 2745-2752
- 16) Schreiber, E. et al. 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucle. Acids Res.*, 17:6417
- 17) Slager, H. G. , Van Inzen, W., Freund, A.J.M., Van den Eijnden-Van Raaij, and Mummery, C.L. 1993. Transforming growth factor- $\beta$  in the early mouse embryo: Implications for the regulation of muscle formation and implantation. *Dev. Genet.*, 14: 212-224
- 18) Kispert, A., and Herrmann, B. G. 1993. The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein. *EMBO J.* 12(8): 3211-3220
- 19) Kispert, A., Koschorz, B., and Herrmann, B. G. 1995. The T protein encoded by Brachyury is a tissue-specific transcription factor. *EMBO J.* 14(19):4763-4772
- 20) Chen, Z-F., and Behringer, R., 1995. twist is required in head mesenchyme for

cranial neural tube morphogenesis. *Genes Dev.* 9: 686-699.

- 21) Srivastava, D., Cserjesi, P., and Olson, E.N. 1995. A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis. *Science*, 270: 1995-1999
- 22) Beiman, M., Shilo, B-Z., and Volk, T., 1996. Heartless, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is essential for cell migration and establishment of several mesodermal lineages. *Genes Dev.*, 10: 2993-3002.
- 23) Gisselbrecht, S., Skeath, J. B., Doe, C. Q., and Michelson, A., 1996. heartless encodes a fibroblast growth factor receptor (DFR1/DFGF-R2) involved in the directional migration of early mesodermal cells in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.*, 10: 3003-3017
- 24) Lough, J., Barron, M., Brogley, M., Sugi, Y., Bolender, D., L., and Zhu, X., 1996., Combined BMP-2 and FGF-4, but neither factor alone, induces, cardiogenesis in non-precordial embryonic mesoderm. *Dev. Biol.*, 178:198-202

