

## 心臓再生に関わる因子と心機能向上を目指した研究

竹内 純

東京医科歯科大学難治疾患研究所 生体情報薬理学講座

### 【研究の背景】

哺乳類の心臓は限定的ではあるが再生能力がある(Porrello et al., *Science* 2011;Sadek, Martin, Takeuchi et al., *Stem Cell Report* 2014)。この系を用いて、申請者は心臓再生時に心筋で特異的に発現亢進する因子としてクロマチン因子 Baf60c を特定し、心筋の再生能力に寄与していることを発見した(*Develop. Growth Differ.* 2016)。申請者らは既に Baf60c が心臓誘導因子であることを報告している(*Nat. Commun.* 2011; *Cardiovas. Res.* 2011; *Nature* 2009)。しかしながら、申請者らの研究も含めて、心臓再生に関与する多くの報告は心筋の性質理解のみに特化している。心臓再生に寄与する細胞は心筋のみなのであろうか？(概念図・下参照: Morita et al. *submitted* 2016b)。心臓再生に寄与する他の細胞を探索した結果、興味深いことに Thy1 陽性細胞が心筋へと分化することを見いだした。さらに、Thy1 陽性細胞に一過的に発現する因子として、申請者は *Sall1* 遺伝子を単離した。*Sall1* は心臓発生において、心筋には発現せず未分化な心臓前駆細胞にて発現している新規心臓前駆細胞因子で、マウス初期胚に強制発現させると心臓前駆細胞マーカーを誘導し、効率よく心筋分化を促進する(特願 2015-187363:Morita et al., *JMCC* 2016)。

### 【目 的】

心臓再生研究は心筋や未分化な心臓幹細胞の性質理解に特化した研究が中心である。しかしながら、心筋・心臓幹細胞のみならず、線維芽細胞・内皮細胞・自律神経などの性質を理解することも重要である。申請者は *Sall1*<sup>+</sup>;Thy1<sup>+</sup> 細胞が心臓再生可能な期間において心筋へと分化することを見出した(Morita et al., *in preparation*)。よって本研究では、人為的ではなく心臓再生過程において心筋へと分化転換能力を持つ線維芽細胞、および心臓内に存在する心筋以外の細胞の性質を明らかにすることを目指す。

### 【方 法】

本研究では、内在的に心筋へと分化する性質を持ち合わせた線維芽細胞を中心として、4 つの研究推進を心がける。

① **Thy1<sup>+</sup> 細胞の性質理解**: 一般に Thy1 陽性細胞は線維芽細胞と考えられているが、実際のところ多くの細胞種において Thy1 抗原を発現することが報告されている。新生仔心臓再生過程において Thy1 陽性細胞から心筋へ分化する先行研究結果をもとに、心臓先芯部における Thy1 陽性細胞の性質の理解を目指す。本研究では以下の2つの手法を用いて心臓内に存在する Thy1 陽性細胞の性質を試みる。

1: 細胞選別法: Thy1, Postin, PECAM(CD31), Sirpa, CD45, Flk1, PDGFRa, cKit を指標にしてセルソーターおよびアナライザーで評価する。また、再培養系において、心筋分化能および他細胞への分化能力においても調べる。

2: 遺伝子発現解析: qPCR を用いて発現している遺伝子群の定量・同定を目指す。

② **心筋以外の細胞集団の分化可塑性の理解: 遺伝子改変マウスを用いて陽性/陰性細胞を選別し、①の結果の再現性を確認する**。具体的には、aMHC-GFP TG マウス(家田真樹講師:慶應義塾大学との共同研究)、Thy1-GFP TG マウス(今井猛教授:九州大学・神戸 CDB と共同研究)および Tie2-mCherry TG マウス(依馬正次教授:滋賀医科大学の共同研究)における心尖部切除後での細胞系譜追跡を行う。1: セルソーターを用いて GFP および mCherry 陽性細胞を選別後、*in vitro* の系を用いて細胞分化を追跡する。2: *in vivo* の系においては心尖部切除後 7 日から 1 ヶ月育成し、切片を作製して免疫組織化学法を用いた解剖学的解析を用いて実証する。

- ③ **心臓再生を向上させるサイトカインの同定**: Thy1 陽性細胞において心臓再生マーカー *Sall1* を誘導させるサイトカイン因子の同定を目指す。心筋再生時における増殖活性および分化転換能を亢進させるようなサイトカイン(分泌性因子)の探索法として *in vitro* の系を確立済みであり、すでに 4 つの候補因子を単離している。この *in vitro* の系を用いて心臓由来 Thy1 陽性細胞および心臓線維芽細胞に投与後マーカーとなる *Sall1* 遺伝子を指標にして同定する。これらの因子は相乗の効果も期待されることから、2~3 因子の同時投与も行う。特定後は、実際に *in vivo* で効果を実証する。また、心筋梗塞マウスでも同様な効果が得られるのか、実証する(笹野哲郎准教授:東京医科歯科大難治研との共同研究)。
- ④ **心臓再生機構における *Sall1* の発現の理由**: RNA シーケンス・ChIP 法を用いて *Sall1* の特定遺伝子への制御機構を明らかにすることを目指す。*Sall1*<sup>+</sup>Thy1<sup>+</sup> 細胞および *Sall1*<sup>-</sup>Thy1<sup>+</sup> 細胞を選別し、RNA シーケンスと定量 PCR(qRT-PCR)を用いて、心臓再生時における生物学的意味を見出す。Heterogeneity な細胞集団と考えられるため、シングルセル RNA シーケンスから遺伝子解析およびバイオインフォマティクス解析を目指す(野村慎太郎助教・小室一成教授:東京大学大学院医学研究科と共同研究で既に single-cell qPCR 系は稼働済み)。また、出生後特異的 *Sall1* 機能破壊マウスおよび *Sall1* 過剰発現マウスにおいて *Sall1* の発現する意味を調べる(西中村隆一教授:熊本大学発生医学研究所と共同研究)。

## 【結 果】

- ① **Thy1<sup>+</sup> 細胞の性質理解**: マウス新生仔心臓心尖部を切除した 24 時間・48 時間・7 日後の心臓において、切除部位から約 100 μm の領域内に存在する心臓組織を搾取しセルソーターを用いて Thy1-APC と PECAM-FITC で展開した。通常(Sham)心臓では、Thy1 陽性細胞と PECAM 陽性細胞はほぼ別の細胞であるが、心臓切除 24 時間後においては Thy1<sup>high+</sup>;PECAM<sup>low+</sup> 細胞が見受けられる。これらの細胞は、ソート直後では心トロボニン(cTnT および Sirpa)陰性であるが、再培養 2 日後に経て心筋へと分化することが分かった。心尖部切除 48 時間後の心臓から同様に Thy1-APC と PECAM-FITC で展開したところ、Thy1<sup>high+</sup>;PECAM<sup>low+</sup> 細胞でのみ SIRPA<sup>LOW+</sup> 細胞が見受けられることが分かった。この結果は、Thy1<sup>high+</sup>;PECAM<sup>low+</sup> 細胞は分化初期では非心筋細胞であるが、心臓再生過程において心筋陽性細胞に分化していると推察される。興味深いことに、非心臓切除の正常心臓においては Thy1<sup>high+</sup>;PECAM<sup>low+</sup> 細胞は存在せず、Thy1<sup>+</sup> 細胞は心筋へと分化することはなかった。また、PECAM<sup>high+</sup> 細胞は Thy1 陰性であり Tie1/Tie2/Vcad 陽性細胞であり、再培養後も PECAM 陽性細胞であり心筋へと分化することはなかった。このことから、PECAM<sup>high+</sup> 細胞は心内皮細胞であると考えられる。また、CD45、Flk1、PDGFRα、cKit 陰性であったことから、Thy1<sup>high+</sup>;PECAM<sup>low+</sup> 細胞は前駆細胞である可能性は低いと考えられる。次に、Thy1<sup>high+</sup>;PECAM<sup>low+</sup> 細胞(T<sup>++</sup>P<sup>+</sup>)・Thy1<sup>high+</sup>;PECAM<sup>-</sup> 細胞(T<sup>++</sup>)・Thy1<sup>-</sup>;PECAM<sup>high+</sup> 細胞(P<sup>++</sup>)の遺伝子発現解析を試みた。T<sup>++</sup>P<sup>+</sup> 細胞では他の分画に比べ *Mef2c/Sall1/Mesp1/Smarcd3/Six1/Six2* 遺伝子の発現が亢進していた。
- ② **心筋以外の細胞集団の分化可塑性の理解**: aMHC-GFP マウスの新生仔心筋はほぼ GFP 陽性細胞である。同マウスを用いて心臓切除を行い 24 時間後の GFP 陽性細胞集団における Thy1 陽性細胞の割合、および Thy1 陽性細胞集団における GFP 陽性細胞の割合を調べた。が存在するのかわかるところ、ほぼ Thy1 陽性細胞は GFP 陰性であった。また、GFP<sup>-</sup>;Thy1<sup>+</sup> 細胞を選別後、再培養すると cTnT 陽性の心筋へと分化した。さらに、同分画から選別された GFP<sup>-</sup>;Thy1<sup>+</sup> 細胞の遺伝子発現について qPCR 法を用いて解析を行ったところ、*Tnnt2/Actc1/Tnni3* 遺伝子において発現の確認ができない、または極端に低発現であった(qPCR 法を用いたため、相対的な評価となる)。一方、*Mef2c/Sall1/Mesp1/Smarcd3/Six1/Six2* 遺伝子などの未分化細胞に強発現している遺伝子群は亢進していた。つまり、この結果は①と同様に、心筋再生時に誘導されてくる Thy1 陽性細胞は非心筋であり分化可塑性を持ち合わせている可能性が高いと考えられる。さらに、一連の実験結果からこれらの遺伝子群は心臓再生に関与する重要な候補因子として考えられる。次に、生体心臓内における Thy1 陽性細胞の局在を確かめるために Thy1 抗体で心臓組織染色を試みたが、残念ながら成体における局在の確認は難しかった。そこで、Thy1-GFP マウスを用いて GFP 陽性細胞を調べることで、Thy1 陽性細胞の局在を見出すことが可能であると考えた。共同研究を開始し Thy1-GFP マウス心臓 GFP 発現を確認した。現在、組織切片を作製して詳細な局在を確認中である。Tie2-mCherry TG マウスについてはようやく作製したところであり、今後この TG マウスを用いて、mCherry 陽性細胞の局在およびにセルソーターを用いて陽性細胞を選別後の分化方向性を調べていく予定である。

- ③ **心臓再生を向上させるサイトカインの同定**: 心筋分化亢進作用のある機能性サイトカインの選別スクリーニングが可能となる培養系を確立するために、比較的少量に簡便に搾取可能な背側真皮から線維芽細胞培養系を選択した(家田真樹講師:慶應義塾大学との共同研究)。この線維芽細胞に心臓で発現報告例のある 10 種類のサイトカインを投与して、上記の候補因子の発現を指標にして Thy1 陽性細胞の心筋分化を促進させるサイトカインの同定を試みた。そのうち 2 種類のサイトカインにおいて上記因子の発現亢進が見受けられた(特許申請中)。特に、低酸素状態での反応が顕著であり、サイトカイン+低酸素状態が線維芽細胞の性質変化に深く関与していることが示された。今後は、心臓から線維芽細胞(aMHC-GFP マウスを用いて GFP<sup>+</sup>;Thy1<sup>+</sup> 分画を選別)のみ選別する *in vitro* 系を構築し、候補サイトカイン+低酸素状態下において心筋分化を促進するのをおよび分子メカニズムを明らかにしていく。
- ④ **心臓再生機構における *Sall1* の発現の理由**: 上記① ②にて発現亢進が見受けられた因子に対して、候補因子の絞り込みを行ったところ、最有力候補として *Sall1* があげられた。そこで、*Sall1*-GFP 新生仔マウス心臓先芯部の切除を行い、GFP 陽性細胞の増加の可否を調べたところ、切除後 24 時間以内に GFP 陽性細胞が 0.2%→3.5%の増加が確認された。この GFP の発現は切除後1日目が見受けられ、切除後1週間のうちには元の細胞数のレベル(0.3%)にもどった。次に、このような一過的な GFP 陽性細胞の増加の意味を調べるため、セルソーターを用いて GFP 陽性細胞を選別後、再培養を行った。GFP 陽性細胞を選別後 *in vitro* の系を用いて 5 日間の再培養を行ったところ、開始後 2 日後には cTnT 陽性の心筋が見受けられた。選別直後の GFP 陽性細胞は 70%において Thy1:PECAM の共陽性であり、cTnT および Sirpa 陰性の細胞群であった。このことから、*Sall1* 陽性細胞は結果①で示した Thy1<sup>high</sup>;PECAM<sup>low</sup> 細胞(T<sup>++</sup>P<sup>+</sup>)の主たる機能因子の一つであると考えられる。さらに、生体内においても *Sall1* 陽性の細胞が心筋へと分化するのかが確かめるために、*Sall1*creERT2;ROSA-YFP マウスを作製し、心筋切除 1 日後に Tamoxifen を投与し、*Sall1* 陽性細胞の追跡を試みる手法を用いることにした。同マウスを用いると Tamoxifen 投与で嘗て *Sall1* 陽性だった細胞の系譜を追跡することが YFP 陽性細胞を確認することで可能となる。そこで、同マウス新生仔心臓心尖部を切除 1 日後に Tamoxifen を投与して YFP 陽性細胞の動向を調べた。興味深いことに、Tamoxifen 投与後 5 日目心臓の切片を作製し cTnT 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、嘗て *Sall1* 陽性であった一部の細胞は cTnT 陽性の心筋へと分化していた。また、Tamoxifen 投与後 1 日目の YFP 陽性細胞は cTnT 陰性であった。この結果から、*Sall1* 陽性細胞は非心筋細胞を認識しており、心尖部切除を行うと活性化され増殖し一部心筋へと分化する能力を持っているということが分かった。この過程での *Sall1* 陽性細胞は Thy1<sup>high</sup>;PECAM<sup>low</sup> 細胞であり、今後性質の理解が求められる。

## 【考 察】

- ① **非心筋細胞の Thy1<sup>+</sup> 細胞の性質理解**: 本研究結果により、Thy1 陽性細胞の性質は一様ではなく幾つかの特性の異なった細胞集団であることが示された。今後は、Thy1 陽性細胞のより詳細な性質理解のために single-cell RNA シーケンスを用いた解析が必要となると考えられる。早急に取り組む。また、心臓再生に寄与する生体内における Thy1 陽性細胞の局在を調べる必要がある。現在の Thy1 抗体では鮮明な染色像をえることが難しく、Thy1-GFP マウスを用いることが課題の解消につながると期待される。さらに、FACS および MACS 法を用いて、より詳細に Thy1 陽性細胞の性質理解を進める。
- ② **心筋再生に関わる因子の理解**: 今研究で、心臓再生時に Thy1 陽性細胞において発現変動する遺伝子が選出された。これらの遺伝子群は胚発生において未分化な心臓前駆細胞に強く発現している遺伝子群である。つまり、心臓再生時には前駆細胞様性質まで運命が撤き戻る細胞が存在していると推測される。今後はこれらの遺伝子の遺伝子破壊マウスおよび強制発現マウスを用いることで、再生時における重要性が示されると考えられる。また、レポーターのダイレクトにノックインした TG マウスを用いることで陽性細胞を選別し、*in vitro* の系を用いて分化動向の追跡が可能である。今後取り組む必要がある。今回の研究では費用面の課題がクリアできず取組めなかったが、再生に寄与する/しない Thy1 陽性細胞間において RNA-seq および Chip-seq をすることにより、心臓再生時どのような特定の遺伝子にて発現変化が起こり、どのような特定のゲノムにおいて構造再編成が起こるのか、明確になる。また、其れには何か共通性があるのかも見出せると考えられる。
- ③ ***Sall1* 遺伝子の発現の理由**: 本研究により、zinc-finger 用転写因子である *Sall1* 遺伝子が心臓再生時に Thy1 陽性細胞

胞に強く発現することが見出された。また、Sall1-GFP マウスを用いて同様に心臓心尖部の切除 1 日後の GFP 陽性細胞をセルソーターを用いて選別し、*in vitro*の系で培養すると 2 日間で心トロポニン陽性の心筋が分化してくることが分かった。この GFP 陽性細胞は選別時心トロポニン陰性の非心筋細胞であることから、Thy1;Sall1 陽性細胞は特殊な細胞であると推測される。課題としては、3 つある。① なぜ心臓再生時に休眠から目覚めたように反応し心筋分化を開始するのか、通常は分化しないのか。加齢に伴って反応しなくなるのか。② 外環境からのシグナルに反応していると考えられるが、その場合どのようなシグナルであると考えられるか。また、そのソースはどこであるか。③ 生体内にどのように局在するのであろうか。心臓心尖部に多く存在するのであろうか。切除部位近傍にある Thy1 陽性細胞が反応するのであろうか。この課題がクリアできたとき、新たなサイエンスが開拓されるものと考えられる。

#### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究で得られる知見は、iPS 細胞やダイレクトリプログラム技術のような人為的ではなく内在性の細胞においても分化転換する能力を持ち合わせていることを証明した。また、線維芽細胞をより可塑性を持った性質変化させるサイトカイン候補も見出した。本研究結果はヒト心不全を予防する・緩和するのに役立つサイトカインや創薬研究への手がかりとなるだけでなく、心臓再生のみならず他臓器再生研究への展開も見込まれると推測できる。さらに、本研究結果はより効率良くダイレクトリプログラムを誘導できる線維芽細胞研究や、他臓器における線維芽細胞自身の性質理解を見直すこととなり、再生医療研究に貢献するものと考えられる。

#### 【参考・引用文献】

1. Tsuji M., Kawasaki T., Matsuda T., Arai T., Gojo S. and Takeuchi JK\*. Sexual Dimorphisms of mRNA and miRNA in Human/Murine Heart Disease. *PLOS ONE in press* 2017. \*: [correspondence to this work](#) (査読有り)
2. Morita Y., Andersen P., Hotta A., Tsukahara Y., Sasagawa N., Hayashida N., Koga C., Nishikawa M., Saga Y., Evans SM., Koshiba-Takeuchi K., Nishinakamura R., Yoshida Y., Kwon C. and Takeuchi JK. \* Sall1 transiently marks undifferentiated heart precursor and regulates their fate. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 92; 158-162. 2016. \*: [correspondence to this work](#), 表紙掲載 (査読有り)
3. 中川博揮、竹内純「心臓発生・疾患とクロマチンリモデリング複合体」生体の科学VOL.168, 6 536-542, 2017
4. 森田唯加、竹内純「7節 iPS細胞から心筋細胞への分化誘導の安定化・効率化(iPS細胞の最新技術開発)」技術情報協会 2016(9月)10月発刊
5. Morita Y., Hotta A., Hayashida N., Ohtaki N., Kojima M., Nishinakamura R., Qian L., Takeuchi JK. 「Specified Thy1+ fibroblasts differentiates to cardiomyocytes during heart regeneration in vivo/in vitro」『International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 2016 Annual Meeting』, San Francisco, 2016年 6月(選抜口頭発表;査読有り ISSCR Award)
6. 森田唯加、竹内純「心臓運命をプログラムする因子とその発展性」第38回日本分子生物学会、神戸 2015年12月(選抜口頭発表;査読有り 日本分子生物学会若手発表者賞)