

心内膜による心筋分化制御機構の分子基盤

佐波理恵

大阪大学大学院医学系研究科 心臓再生医療学 共同研究講座

【研究の背景】

心臓を構成する多様な細胞群のほとんどは胎生初期の予定心臓領域に生じる心臓前駆細胞から派生するが、各心臓細胞系列への分化制御機構には不明な点が多い。心内膜は、心臓形成の最初期より心筋とともに出現してその後の形態形成に寄与し、特に心室心筋層の肥厚過程では心筋細胞の分化増殖を制御する必須な役割を担う。しかしその細胞特性に関する既存の知見は心筋と比較して極めて少なく、また多能性幹細胞からの誘導心筋を用いた心不全に対する新規細胞治療法の開発に心内膜の機能を利用しようとする試みもほぼ無いのが現状である。

我々は先行研究において、マウス胎生初期の予定心臓領域において心内膜前駆細胞が転写因子 *Sox17* を発現し、その欠損により胎生中期に分化増殖異常を伴う心臓形態形成不全が生じることを発見した¹⁾。さらに *Sox17* 欠損胚の心筋・心内膜両細胞系列の遺伝子発現プロファイルには、形態形成異常に先立って心臓形態形成の初期から有意な異常が生じることを明らかにした。これらの結果は心内膜前駆細胞で生じた異常を心筋細胞が胎生初期から感知してその影響を受けていることと、胎生初期からの心内膜と心筋両細胞間の相互作用が胎生中期以降の正常な心臓形態形成に必須であることを示している。

【目 的】

本研究は、マウス胚心円筒形成過程での心内膜細胞系列の系譜と細胞特性の分子基盤を明らかにし、この知見を元にした多能性幹細胞からの心内膜細胞系列分化誘導系の開発及び将来的な部位特異的なヒト心臓オルガノイド系構築を目指した心筋分化増殖制御機構の解明を目的とする。

【方 法】

以下の 3 つの実験項目に基づき本研究を遂行している。

1) マウス胚発生過程における心内膜前駆細胞の系譜追跡と細胞特性の解明

遺伝子改変アリル *Sox17^{mCherry}2)/Mesp1^{Cre}3)/Rosa^{eYFP}4)* を持つマウス胚を用いて、初期発生過程における中胚葉性の *Sox17* 発現細胞 (心内膜前駆細胞を含む) の時空間的配置を明らかにする。さらに、新たに遺伝子改変アレル *Sox17^{2A-CreErt2}* 及びトランスジーン *CAG-RF-Lyn-eYFP* を持つマウス系統を作成し、*Mesp1^{Dre}* アレルを持つマウスと交配して得た胚仔を用い、時期特異的な中胚葉性 *Sox17* 発現細胞の系譜を心円筒形成に注目して追跡する。

2) 多能性幹細胞からの心内膜細胞分化誘導系の構築

心内膜前駆細胞の出現を、心臓前駆細胞マーカー *Nkx2-5*⁵⁾ と *Sox17* の発現を指標として検出するためのレポーター遺伝子を持つマウス ES 細胞株を樹立する。この細胞株を用いて心内膜前駆細胞を高効率に得るための分化誘導系を確立し、純度の高い心内膜細胞シートを構築する。

3) 心内膜・心筋細胞シート共培養系の確立による心内膜・心筋細胞間相互作用の分子基盤解析

項目 1) で得られた心内膜細胞シートと、先行研究で構築した心筋前駆細胞特異的表面抗原 GFRA2 の発現を利用して作成した心筋細胞シート⁶⁾ を、ボイデンチャンバーを用いて共培養する。この培養系を用い、*Sox17* を欠損する ES 細

胞より誘導した心内膜細胞層と野生型の心筋細胞層を共培養し、心筋細胞の分化増殖に対する影響を分子生物学的、細胞学的、生化学的に解析する。

【結 果】

実験項目 1) 遺伝子改変アレル *Sox17^{mCherry}*、*Mesp1^{Cre}*、*Rosa^{eYFP}* を持つマウス系統を交配し、安定的に複合変異マウス胚を得られる様、繁殖コロニーを拡大した。ここから得られた胎生 7.0~8.5 日の胚仔を用いて全胚免疫染色を行い、ライトシート顕微鏡により連続的な 3D 画像を取得している。また、新たに遺伝子改変アレル *Sox17^{2A-CreErt2}* 及びトランスジーン *CAG-RF-Lyn-eYFP* を持つマウス系統の作成を行っている。作成したマウス系統と交配するための *Mesp1^{Dre}* アレルを持つ変異マウスを国立遺伝学研究所発生工学研究室(相賀裕美子教授)より導入し、繁殖コロニーの規模を拡大している。

実験項目 2) 心内膜細胞への分化経路を再現する *in vitro* の分化誘導系を開発するため、心内膜前駆細胞の出現を心臓前駆細胞マーカー *Nkx2-5* と内皮前駆細胞マーカー *Sox17* の共発現により検出するためのレポーター遺伝子群を持つマウス ES 細胞株を樹立した。BAC トランスジーン *Nkx2-5^{EYFP-BghA}* を構築し、これをエレクトロポレーションにより *Sox17^{mCherry}* アレルを持つ ES 細胞へ導入した。現在この細胞株を用いて心内膜前駆細胞系列への分化誘導条件検討を行なっている。

実験項目 3) 項目 2) が完了次第、開始予定である。

【考 察】

Sox17^{mCherry}/Mesp1^{Cre}/Rosa^{eYFP} 複合変異マウスを用いた全胚免疫染色による 3D イメージングにより、中胚葉性の *Sox17* 発現細胞群は、予定心臓領域での分布のみならず胚体前方においても認められた。これらは動脈内皮前駆細胞群であると考えられる。特に、多能性幹細胞からの胚様体形成を経た心内膜前駆細胞分化誘導時には、胚体内のような位置的情報が存在しないため、*Sox17* 単独では心内膜前駆細胞と動脈内皮前駆細胞を区別することが難しい。本研究では心臓前駆細胞マーカーとして *Nkx2-5* を用いているが、心内膜系列への分化決定が中胚葉分化の時点で行われている可能性を示唆する報告もある⁷⁾。高効率な分化誘導系構築のため、胚体内での中胚葉から心内膜前駆細胞への初期分化過程における連続的な単一細胞発現プロファイル取得により心内膜系列特有の遺伝子発現様式を解明し、各分化段階での利用可能な細胞表面抗原を同定することが急務である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

2006 年の iPS 細胞誘導法の確立⁸⁾以降、多くの臓器を対象とした細胞分化誘導系の開発が各国で精力的に進められている。心臓では重症心疾患治療目的での心筋細胞分化誘導系が開発されているが、他の心臓系列細胞の分化誘導系の開発は遅れている。先行研究結果で示された様に心筋の正常な分化増殖には心内膜による誘導が必須であるが、心臓形成過程での心内膜の役割に注目して *in vitro* での心筋培養実験系を構築している例は未だ無い。本研究で得られる成果が、再生医療目的での新規細胞治療法開発、新薬スクリーニング及び将来的な部位特異的心臓オルガノイド系構築に向けた重要な技術および知識基盤となると考えている。

【参考・引用文献】

- 1) Saba et al., bioRxiv, doi: <https://doi.org/10.1101/548289>, 2019.
- 2) Burtcher et al., *genesis* 50: 496-505, 2012.
- 3) Saga et al., *Development* 126, 3437-3447, 1999.
- 4) Srinivas et al., *BMC Dev Biol.* 1:4, Epub 2001.
- 5) Lyons et al., *Genes Dev.* 9(13):1654-66, 1995.
- 6) Ishida, Saba et al., *Cell Reports*, 16(4):1026-38, 2016.

- 7) Lescroart et al., Science, 359(6380):1177-1181, 2018.
- 8) Takahashi and Yamanaka, Cell, 126(4):663-76, 2006.