

心臓発生とその分子メカニズム

^a 東京大学理学系研究科生物学科

^b 東京大学分子細胞生物学研究所心循環器再生研究分野

^c 戦略的創造研究推進事業さきがけ「iPS細胞と生命機能」

Yuika Morita 森田唯加 ^{a,b}

Kazuko Koshiba-Takeuchi 小柴和子 ^{a,b}

Jun K. Takeuchi 竹内 純 ^{a,b,c}

KEY WORDS

- 心臓誘導
- 転写調節因子
- 心筋マスター因子
- 心特異的クロマチン結合因子
- 心臓再生

この20年間で、多くの心臓発生・先天性心疾患に関わる心臓形成因子が単離され解析されてくるに従って、それらは単独ではなく特定の遺伝子との協調的作用、つまり機能複合体を形成し機能していることが明らかとなってきた。心臓区画化、先天性心疾患の重篤性、心臓構成細胞の運命決定において、心臓転写因子とクロマチン結合因子がどのように関係し、複雑な心臓を構築するのか、最新の心臓発生研究トピックスを統括し紹介したい。

はじめに

ES/iPS研究が進展されるに従って、心臓研究は1990年代の心臓区画化因子または心疾患責任遺伝子の単離・解析から、心臓誘導や心臓再生を引き起こす因子の同定に注目が集まってきた。さらに、心臓研究は年々多角化してきており、分泌性因子研究から特定遺伝子の組み合わせによる心特定細胞誘導研究へと専門化・複雑化してきている。既知のとおり、心臓は心筋のみでは構成されず、多くの特徴的な細胞群から形成される。われわれの生命維持器官としての心臓の機能を知るためには、心臓を構成する細胞個々の由来とその機能を理解し、それらがどのような特定の因子によって運命付けられて派生してくるのか、どのように連携しているのか理解することが必要となってきている。さらに昨年、哺乳類の心臓を構成する細胞、特に心筋にも可塑的な状態が存在し、再生可能であること

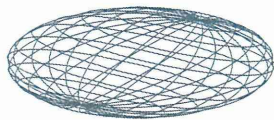
が明らかとなってきた。

上記のような理由から、心臓発生と心臓を構成する細胞群の分化と由来について整理しておく必要があると考えられる。このような統合理解が、心不全患者、先天性心疾患患者を救う道を切り開く手助けとなるのではなかろうか。

本編では、心臓の発生を整理しながら、心臓発生における個々の細胞群派生に関わる因子を初期から胎生後期にわたって関連付けて述べていきたい。さらに、転写因子とエピジェネティック因子が相乗的に細胞運命や心臓形成に深く関わることについても報告し、今後続く本シリーズのテキストとなる構成としたい。

心臓の発生における区画化因子と心臓構成細胞の派生

心臓発生に重要な因子の役割には、どのような一貫性があるのだろうか？ 因子間の上下のシグナルカス



ケードを整理する必要がある。本章では、特に心臓を構成する細胞において特異的に発現している遺伝子または蛋白質を列挙しながら、心発生過程と関連付けて述べたい。

1. 初期心臓発生における中胚葉誘導

心臓は哺乳類の胚発生過程において、特定のシグナルを受けて中胚葉から分化誘導される、最も初期に形成される臓器である。1つの臓器が10種類以上の細胞群で構成されており、それぞれの機能や局在、形態も多岐にわたっている。したがって、心臓は実に精巧で繊細な発生過程をたどる、協調性を有した臓器と言える。

心臓構成細胞は、原腸陥入の過程で原始線条(primitive streak; PS/図1参照)と呼ばれる中胚葉系細胞の起源となる領域の、特に頭側中胚葉から派生する。この派生領域は生物種を超えて保存されていることが、TamやKirbyらによって報告されている¹⁾⁻³⁾。

マウス胚における中胚葉は胚性5.0日目に、近位胚盤葉上層(proximal epiblast)からのNodalシグナルによって引き起こされる。Nodalシグナルは、胚盤葉上層に隣接する胚体外外胚葉にてBmp4の発現を維持するが、Bmp4自体は、近位胚盤葉にてWnt3の発現を誘導する。胚性5.5日目では、WNTの拮抗因子のDkk1や、Nodalの拮抗因子であるLefty1やCer1が前方前側内胚葉へと遊走し、後方胚盤葉上層のNodal, WNTシグナルを抑制する。胚性5.75日目には、WNTシグナルが中胚葉遺伝子(Brachyury, Eomes, Mixl1, Evx1)の発現を誘導し、のちにこれらの因子によって初期心臓中胚葉遺伝子(Mespl, Flk1, Pdgfra)が直接誘導されることがCostello, David, Lindsleyらによって示されている⁴⁾⁻⁶⁾。EomesとTbx6は、ともにT-box遺伝子に属する初期中胚葉性系譜を示す転写因子であるが、最近の報告では上流でMesplの発現を直接制御することが明らかとなった⁴⁾。次に、中胚葉誘導を受け、Gsc(グースコイド)、Mespl, Flk1(VEGF受容体)などの初期心臓中

胚葉特異的な遺伝子群の発現が見受けられる。

心臓を構成する細胞群は、主にMespl陽性またはFlk1陽性だった中胚葉由来の細胞から分化してくることが、マウス遺伝学を用いた細胞系譜追跡とES細胞を用いた分化誘導系にて報告されている。Mespl遺伝子座にCreリコンビナーゼが挿入されたMespl-CreマウスとROSA遺伝子座にlacZ遺伝子をノックインしたR26R-lacZレポーターマウスと交配し、Mesplの細胞系譜を追跡したところ、胚性9.5日目において、洞房結節以外の心筋、内皮、心内膜、心外膜を含むほぼすべての心臓細胞に分化していることが明らかとなった⁷⁾⁸⁾。ES細胞にMesplを過剰発現させた実験では、Wntシグナル非依存的に心筋誘導が引き起こされ⁹⁾、ゼブラフィッシュを用いた実験においてもMesplの強制発現によって異所的な拍動心筋が観察された¹⁰⁾。しかしながら、Mesplは心臓運命を規定するだけでなく、側板中胚葉由来の前肢間充織や沿軸中胚葉由来の骨格筋や平滑筋、血管などに分化することが示されている。よって、Mespl由来の細胞の一部は、心臓系譜にはのるが、いかにして心臓系譜のみに分化制御が可能かが大きな課題である。

Mesplに限らず、Flk1もまた心臓中胚葉分化に重要な因子のひとつである。ES細胞の分化誘導実験において、Brachyury/Flk1陽性細胞が初期心臓中胚葉の系譜を持つ因子であることが示されている¹¹⁾。また、2000年にはYamashitaらによってFlk1が血管前駆細胞を誘導することが報告されており¹²⁾、2008年にはヒトにおいてFlk1(KDR)陽性細胞が心血管前駆細胞として機能し、心筋や血管を誘導することがKellerらによって報告されている¹³⁾。

2. 心臓形成に寄与する4つの領域

現在までに報告されている限りにおいて、心臓は主に4つの異なる領域から遊走し、分化した細胞集団によって構成される。それぞれの領域に由来する細胞は発生上、特定の領域から派生し、共通の心臓前駆細胞を起源としていると考えられている。しかしながら、

領域が細分化された発生段階では、すでに発現する因子や、分化の方向性が異なっている。

1) 第一心臓予定領域

心臓を構成する領域の中で、最も古くから研究が行われており、心臓形成領域とも呼ばれている。頭側側板中胚葉由来の細胞集団から発生し、これらの細胞群が存在する領域を第一心臓予定領域(the first heart field; FHF/図1:赤)と称する¹⁴⁾¹⁵⁾。

FHFは、マウスでは胚性7.5日目(ヒトでは約15日目)において、三日月状の馬蹄型を示す心原基(cardiac crescent; CC/図1:赤)を形成する。その後、マウス胚性8.0日目(ヒトでは20日目:約3週間目)に左右両側の細胞が腹側正中線上において融合し、1本の管状形態である原始心筒(primary linear heart tube)を形成する。この原始心筒は主に2層で構成されており、外部層を心筋細胞、内部層を心内膜細胞が構成している。この2層の間のシグナル伝達を細胞外マトリックスが担っている。原始心筒が形成されると、血管を送るポンプとして機能し始める¹⁶⁾。さらに発生が進むと、原始心筒は動脈極-静脈極を固定したまま右方へ強くルーピングし、心臓の外形を大きく変える。マウスにおける胚性10日目(ヒトでは約1ヵ月以降)では心房-心室間に中隔および弁形成が始まり、2心房2心室を形成し、内部形態にも変化が生じる。すでにこの発生段階では、FHF以外の細胞集団(第二心臓予定領域由来の細胞、神経堤細胞、心外膜前駆組織、咽頭弓中胚葉)が心臓構成細胞に分化しながら心臓形成領域に遊走する。また、マウスにおいては胎生期10日目以降(ヒトでは胎生期50日以降)に心臓成熟および血管再構成(成熟&リモデリング)が行われる¹⁶⁾¹⁷⁾。心室筋成熟には、心内膜由来のNeureglin系、FGF、また、心外膜由来のレチノイン酸系およびエリスロポエチンが関与している。これらの過程を経て、それぞれ機能を有した成熟心臓構成細胞に分化、連携することによって複雑化された機能臓器が形成される。

2) 第二心臓予定領域

2001年、ほぼ同時に3つの研究室から、将来的に

心臓を構成する未分化な細胞集団がFHF以外にも存在することが報告された¹⁸⁾⁻²⁰⁾。咽頭弓中胚葉領域から派生する細胞集団が心臓前駆細胞として存在すると報告されたが、その領域は咽頭弓中胚葉領域の一部と心臓の流出路の一部を構成するというものだった。前方心臓領域(AHF)、または二次心臓予定領域(secondary HF)と、命名もさまざまであったが、2003年にLIMホメオボックス型転写因子であるIslet1を用いた研究により、呼び名は第二心臓予定領域(second heart field; SHF/図1:青)と統一されつつある。マウス胚性7.5日目にFHF(図1:赤)に隣接して、より広い頭部側中胚葉、咽頭内胚葉から派生してくることや、細胞系譜追跡の結果、Islet1陽性細胞は流出路、右心室、両心房を構成し、さらには流入路側からも心臓に入り込んでいることが明らかとなり、SHFの概念はより広いものとなった²¹⁾。興味深いことは、SHF自体が心臓を形作る領域ではなく、心臓形成領域に遊走しながら特定の心臓構成細胞に分化することにより、心臓の形成に寄与することである。これは正中線由来のWntシグナルによりSHFの細胞集団の未分化性が維持されていると考えられている¹⁴⁾。

また、これまでにマウスやニワトリ、アフリカツメガエルに、心臓形成に寄与するSHFが存在するが¹⁸⁾⁻²²⁾、近年ゼブラフィッシュにおいても、Itbp3(latent TGF- β binding protein 3)によって規定されるSHFが発見され、前駆細胞の増殖に重要な因子であることが明らかとなった²³⁾。この発見により、SHFは種間を超えて保存された、心発生に重要な領域であると言える。さらに、SHFにおいて発現するTBX1、FGF8の転写制御異常が先天性心疾患のDiGeorge症候群を発症することや、SHFを摘除したニワトリ胚でFallot四徴症(TOF)や肺動脈閉鎖症が発症することが、これまでに明らかにされている。

3) 心臓神経堤細胞

神経堤細胞とは胎生初期において、神経管の背側から派生する外胚葉由来の細胞集団であり、遊走能力に優れている。また、多分化能を有しており、さまざま

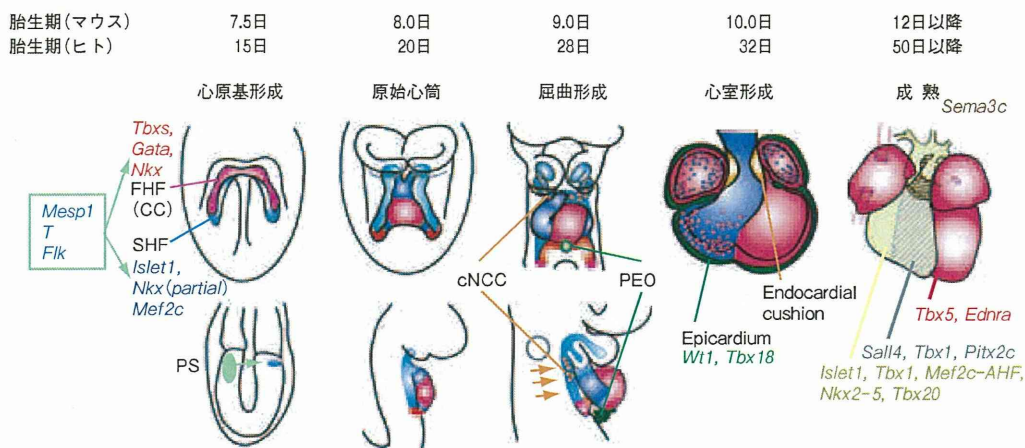
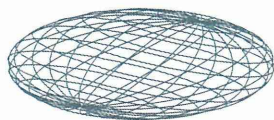


図1 哺乳類(マウス・ヒト)における心臓発生と心臓区画化形成因子
 (塚原由布子, 小柴和子, 竹内 純: 心臓発生にかかわるクロマチン・ヒストン制御の役割. Heart View 15 : 55-63, 2011)

な細胞(交感・副交感神経細胞, 感覚神経細胞, グリア細胞, 色素細胞, 平滑筋, 軟骨, 結合組織, 線維芽細胞など)に分化する。心臓での機能は心臓神経堤細胞(cardiac neural crest cell; cNCC/図1: オレンジ)を切除したニワトリ胚を用いて明らかにされており, 円錐動脈幹・大動脈弓異常, 胸腺, 副甲状腺の形成に関与している。また, Splotch マウスにおいて, 神経堤細胞の制御因子 Pax3 に異常を引き起こすと, 神経堤細胞の遊走に異常が生じ, 結果として SHF における Islet1 陽性細胞の異所的発現を伴う流出路形成不全を引き起こすことが報告されている²⁴⁾。心臓神経堤異常と推察される心臓流出路異常を伴ったヒト先天性心疾患は, 全先天性心疾患患者の 30% と非常に高頻度に発症することからも, 責任遺伝子の単離と機能解析が急がれている。さらに, 一部の神経堤細胞は成体組織においても, 神経堤幹細胞として未分化性を維持している²⁵⁾⁻²⁷⁾。出生後のマウスに対し人工的に心筋梗塞を誘発させると, これら神経堤幹細胞が, 心筋を含む多様な細胞に分化し梗塞部位の修復に関与することが明らかとされた²⁸⁾。今後, 神経堤幹細胞を用いた細胞医療への応用が期待される。

4) 心外膜前駆組織

原始心筒後方に接する臓側中胚葉由来の細胞集団であり, 静脈洞側から心臓全体を覆う心外膜形成に重要と考えられている細胞集団領域を, 心外膜前駆組織(proepicardial organ; PEO/図1: 緑)と称する。代表的な心外膜前駆組織因子としての Wt1 および Tbx18 によって規定される細胞集団は, 心室後壁から房室溝, 心室間溝, 心室前壁, 心房流出路とシート状に心臓全体を覆う。また, 心外膜形成にかかわらず, 一部の細胞は形質転換(epithelial mesenchymal transformation; EMT)し, 心筋層に入り込むことで血管形成に関与する。興味深いことに, PEO で発現する細胞の一部が胚性 10.5 ~ 11.5 日目までに心筋細胞へと形質転換することが明らかとなり, 心外膜由来の細胞も心臓前駆細胞と考えられている。Wt1 陽性心外膜前駆組織は Nkx2-5 や SHF マーカー Islet1 を発現していることから, 共通の前駆細胞から派生したと考えられている。

心臓領域特異的な遺伝子マーカーと細胞系譜解析

上記で紹介した4つの領域形成に関わる遺伝子には、どのような特徴があるのだろうか？本章では、特に心臓区画化形成に重要な6つの遺伝子ファミリーについて概説したい。

1. Tbx 遺伝子

T-box ファミリーは細胞運命や臓器内の区画化(コンパートメント)形成に重要な制御因子として知られており、これまでに24種類のT-box 遺伝子が報告されている。心臓発生においては7種類のTbx 遺伝子が機能しており、うち5つがヒト先天性心疾患の責任遺伝子として報告されている[TBX1; DiGeorge 症候群, TBX3; Ulnar-mammary 症候群, TBX4; Small patella 症候群, TBX5; Holt-Oram 症候群, TBX20; ostium secundum atrial septal defect (心房中隔欠損, 弁形成不全, 心筋症)]. Tbx 遺伝子の大きな特徴のひとつとして、Tbx 遺伝子の相互作用および発現領域の相違により、心臓の初期区画化(コンパートメント)形成に関わることである(図2²⁹⁾: e8.25)。図2に示すように、哺乳類の初期心臓コンパートメントはTbx 遺伝子の発現領域で区域分けすることが可能である。

胚性8.25日目でSHFに発現するTbx1(図2: 緑)は、主に、①SHFにおける細胞増殖・分化を時空間的な制御と、②心大血管系パターンニングに関与している。Tbx1はShhが発現誘導するFoxC1, FoxC2, FoxA2によって活性化され、Tbx1の下流では、SHFの細胞増殖維持に関わるFgf8やFgf10が機能することや、Pitx2と相互作用して心臓形態に非対称性を生じさせることが知られている²⁹⁾。SHFにおける細胞増殖をFgf10を介して制御しつつ流出路形成や、Nkx2-5を介して大動脈肺動脈を形成するために重要であることが知られている³⁰⁾(本シリーズ次項, 山岸の稿を参照)。Tbx18は心外膜前駆細胞因子として知られており、胚性10日目までは、PEOに発現する。その後、Tbx18はE11.0までに心外膜層を覆うように発現し、胚性14.5日目では心室中隔、左室、洞房結節、静脈洞、静脈洞角に発現が認められ、心筋や平滑筋、線維芽細胞に分化することが明らかとなっている³¹⁾⁻³³⁾。Tbx5は初期発生の流入路、心房、AV cushion, 左室の心筋、平滑筋に発現し、流出路や右室では発現していないことから、主にFHFまたはその派生領域に制限されていると考えられており³⁴⁾、Tbx5遺伝子ノックアウト(KO)マウスでは極度の心臓低形成を伴い、全く拍動せず9日胚で致死となる³⁵⁾。また、Tbx5はZnフィンガー型転写因子Sall4との協調的作用により、心室中隔形成に深く関わっている³⁵⁾³⁶⁾が、

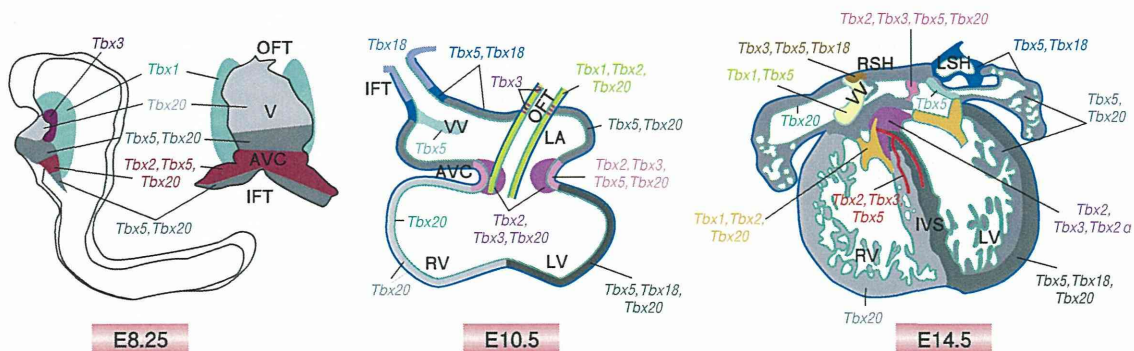


図2 心臓区画化形成に関わるTbx 遺伝子群

(文献29より引用)

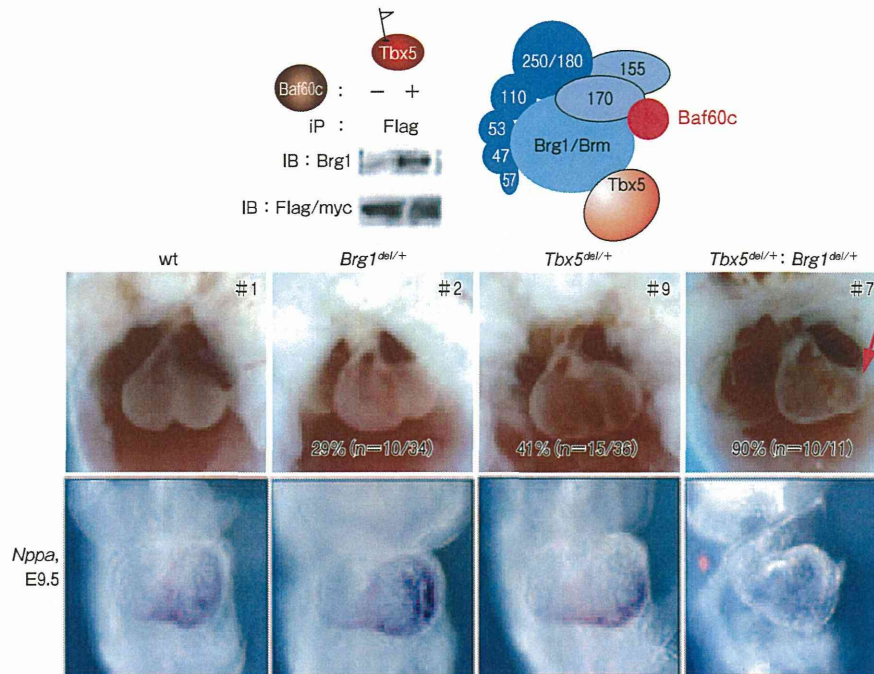
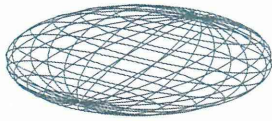


図3 先天的左室低形成疾患はエピジェネティック因子の発現量によって重篤化される

転写因子のみならず、SWI/SNF-BAF クロマチンリモデリング因子と結合し、左室における心筋遺伝子を制御する(後述)。先天性心疾患は、このようなパートナー因子やエピジェネティック因子との相互作用によって、重篤化したり相殺されたりすると考えられる(図3)。今後、エピジェネティック因子の発現量と心疾患発症リスクを詳細に調べた研究が必要である。Tbx20は、FHFの右室側およびSHFに発現しており、Bmp2のシグナルを介して多彩な心筋遺伝子プログラムの開始と維持に関与している。一方で、Tbx2やTbx3はこれらのプログラムを局所的に阻害し、心内膜床形成や刺激伝導系の形成を促進する。

Tbx 遺伝子のもう1つの特徴として、機能部位が発現領域と一致する点が挙げられる。Tbx5のmRNAは左室に強く発現し、Tbx20のmRNAは右室と流出路に強く発現する(図4)。Tbx20遺伝子KOマウスでは図4のように、右室が完全に消失した単心室形態を

呈し、逆にTbx5遺伝子KOマウスでは左室形成不全の単心室形態を示す^{37)–39)}。さらに、Tbx遺伝子の発現領域と区画化形成機構については、哺乳類のみならず脊椎動物の心室形態の多様性と深く相関性を保っている⁴⁰⁾⁴¹⁾(図5)。図5で示すように、青い部分が胚発生時におけるTbx5の発現領域であるが、脊椎動物の心室中隔形成と左右心室区画化形成にはTbx5の発現領域の変化によって獲得したと推測できる。このようにTbx遺伝子の発現領域は形作りにおいて大きな意味があり、細胞の性質(表面抗原、接着性因子、核内転写)を大きく変える能力を持ち合わせていると考えられる。

2. Nkx2-5

Nkx2-5はホメオドメインを有する転写因子であり、ショウジョウバエtinmanの相同遺伝子として同定された。tinman変異体は発生初期ではほとんどの中胚

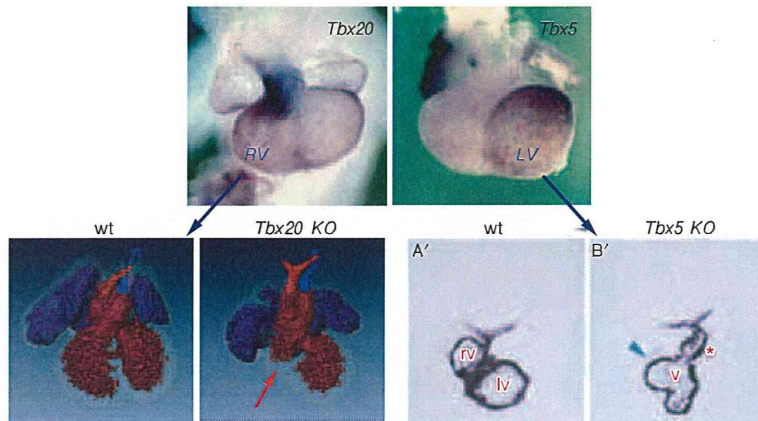


図4 左室形成因子としての Tbx5 と右室形成因子としての Tbx20

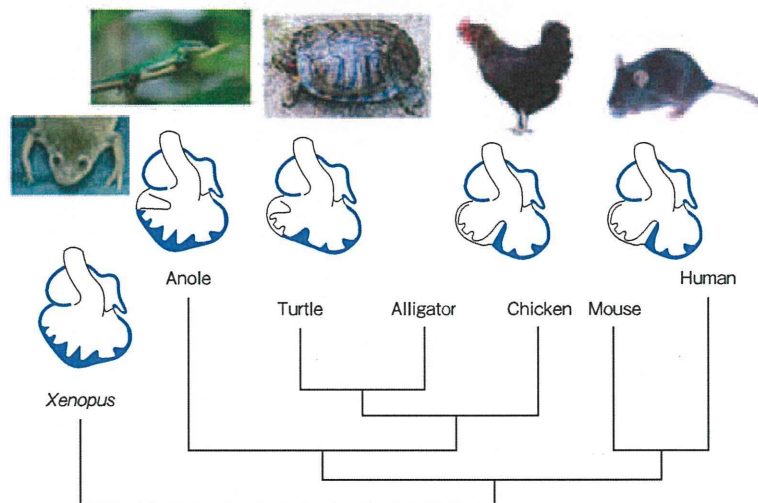
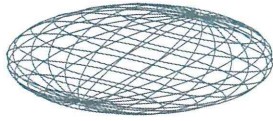


図5 各脊椎動物胚における Tbx5 遺伝子の発現様式の相違と心形態との相関性

葉領域で発現が認められるが、発生が進むにつれて心臓形成領域に局限することが知られている。この因子を欠損させると、完全に心筋分化が阻害されることから、ショウジョウバエの心筋誘導に必須因子であると考えられている。哺乳類に発現する Nkx2-5 は、胚性 7.5 日目から FHF および一部の SHF に発現する。Nkx2-5 KO マウスは、多くの心筋因子の発現が低下

し原始心筒がルーピングする段階で発生が停止し、胎生致死となる⁴²⁾。形態として右室形成異常のほか、流出路の短縮や狭窄がみられることから、Nkx2-5 が流出路形成に関わる SHF 由来の細胞集団の増殖や遊走を制御していると考えられる。また、Nkx2-5 は洞房結節とその隣接する心房筋の境界の維持に重要である。発生過程において、洞房結節(SAN)マーカーで



あり、チャンネル系因子であるHCN4は、Tbx3の発現によりNkx2-5陰性領域に発現が見受けられ、右房内領域においてSAN形成・成熟に寄与する⁴³⁾⁴⁴⁾。さらに、Nkx2-5がEtsrp71を介して心内膜形成を制御していることがこれまでに明らかにされている⁴⁵⁾。残念ながら、Nkx2-5単独強制発現によって異所的な心筋誘導が引き起こされるという報告はないが、*in vitro*強制発現系においてGata4、Tbx5と相互作用することで、ナトリウム利尿ホルモンNppa、ギャップジャンクション構成蛋白Cx40、 α 型心ミオシン重鎖Myhcなどの転写を活性化する^{35)46)~48)}。Nkx2-5のプロモーター上においてもGata、Tbxの結合配列が存在し、その近傍にはIslet1の結合配列が存在し、これらの因子によって直接発現制御を受けている(著者未発表)。また、これまでにNKX2-5の変異によるヒト先天性心疾患は38部位に遺伝子変異が確認されており、心房/心室中隔欠損(ASD/VSD)、房室伝導障害(AV block)、TOF、両大血管右室起始症(DORV)、左心低形成症候群(HLHS)とさまざまな疾患を引き起こすことが知られている。これらのことから、Nkx2-5はtinman同様、初期心臓発生に必要な転写因子のひとつであると考えられる。

3. Gata 遺伝子

Gata 遺伝子は広く種間で保存されたZnフィンガードメインを有する転写因子で、これまでにGata1~6が報告されており、心臓ではGata4~6が発現している。心臓におけるGata5の発現は弱く、心臓のルーピング後に心内膜/心内膜床に隣接した領域の一部の細胞に発現が認められるが、Gata5 KO マウスでは異常な表現型は現れない⁴⁹⁾。Gata4 KO マウスは胚の腹側での融合が阻害されることにより、左右の心臓原基が正中線で融合できず原始心筒が形成されない。主に内胚葉異常が原因で引き起こされる二分心臓が形成され、胚性8.5~9.0日目まで致死となる⁴⁹⁾。Gata6 KO マウスは胚外内胚葉の分化異常が原因で引き起こされる原腸形成不全により、胚性6.5~7.0日目まで致

死となる。4倍体胚レスキュー法を用いて作製されたGata4/6二重KOマウスでは、心臓前駆細胞領域は形成されるが、心筋分化が完全に抑制されることが明らかになっている⁵⁰⁾。また、これまでにGATA4の変異により多くの先天性心疾患(TOF, ASD/VSD, DORV, PTA, PS, AVSD)が報告されていることからGata因子は心臓発生および心筋分化に必要な転写因子であると考えられる。Gata4は出生後の心臓でも強く発現しており、膜受容体やチャンネル、収縮蛋白質、ホルモン、増殖因子などをコードする多くの胎児性遺伝子や体性遺伝子を正に制御し、出生後の心筋増殖やストレス応答に適応することに関与している⁵¹⁾。

4. MADS-box 遺伝子ファミリー

1) Mef2c

これまでに高等脊椎動物において4つのMef2因子が報告されており、なかでもMef2c KOマウスは、心臓のルーピングが起らず右室低形成を示し、胎生10日目までに致死となることが知られている。これらのことからMef2cはSHF由来の組織の初期発生に重要な因子であると考えられる⁵²⁾。また、Mef2cは多くの心筋構造遺伝子(Nppa, 心アクチン, α -MHC, MLC1a, アンジオポエチン1, Vegf)の発現を直接的または間接的に制御していることから心筋の分化に寄与していると考えられ⁵³⁾。一方で、Mef2cはNkx2-5, Gata4, Islet1, Foxh1によって直接発現が制御されていることが明らかにされている^{54)~56)}。

2) SRF/Myocardin

SRFは非常に広い領域に発現している転写因子であることから、さまざまなCreマウスを用いてコンディショナルKOマウスが作製されている。心筋特異的にSRFの機能を損失させると、アポトーシスの増加、細胞増殖の減少、さらには心筋成熟が引き起こされずに胎生致死となることが、これまでに報告されている^{56)~58)}。また、心臓特異的因子Nkx2-5Creマウスを用いたSRFコンディショナルKOマウスでは、 α SMや α 型心アクチン遺伝子の発現が顕著に減少す

ることから、筋分化に重要な因子であると考えられる⁵⁹⁾。実際に、SRF 遺伝子は胚性 9.5 日目までに発現がほぼ消失するが、蛋白質はその後の発生過程においても残存して、収縮性蛋白質のターンオーバーに寄与していることが報告されている⁵⁸⁾。Myocardin は SRF の補因子として単離され、カエルを用いたノックダウン実験ではトロポミオシン、Nkx2-5 が消失し、さらに、カエル胚に Myocardin を強制発現させると心アクチンが誘導されることから、心筋誘導因子として期待された。しかしながら、拍動する心筋は確認できず、サルコメア構造を持った心筋も確認されなかった。遺伝子 KO マウスでも心臓形成されることが、のちに報告されている^{59) - 61)}。

5. Islet1

発生初期 SHF に発現する LIM ホメオドメインを持ったホメオボックス型転写因子であり、KO マウスでは右室形成不全や流出路低形成を呈する。実際に Nkx2-5、Mef2c、Hand2、Foxh1 などのプロモ-

ーター上に Islet1 の結合配列が報告されており、右室を形成するうえで重要であるとされる因子群を上流で制御している²¹⁾⁵⁴⁾⁵⁵⁾。また、Islet1 を直接制御する因子として β -カテニンが報告されている⁶²⁾。2009 年には、ヒト胎児心臓に ISLET1 陽性細胞が存在し、これらの細胞は自己複製能かつ分化多能性を有する心臓幹/前駆細胞で、機能性心筋や平滑筋など主要な心臓構成細胞に分化することが明らかにされた。このことは、ヒトの心臓も幹/前駆細胞依存的な再生能力を有していることを表しており、今後、成体心臓幹/前駆細胞の制御メカニズムが明らかにできれば臨床応用にも期待ができる。

心臓誘導因子と運命決定因子

上記因子以外に心臓発生に関わる因子は非常に多く報告されている。これらの遺伝子は詳細に解析されており、心臓発生過程に関わる因子の相関性・シグナル

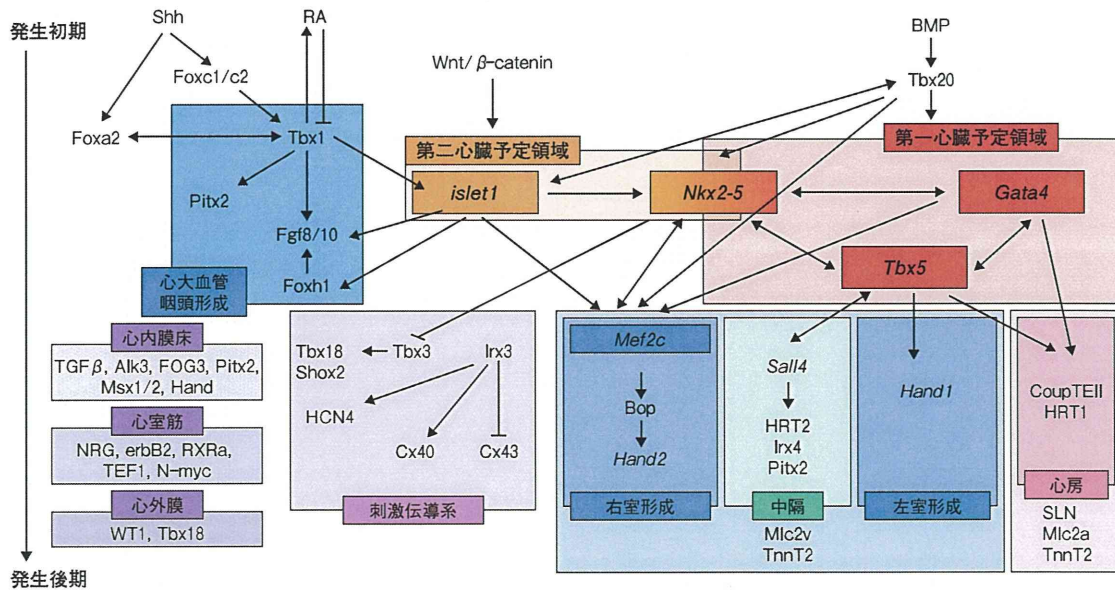
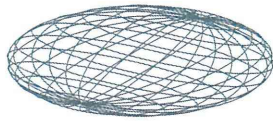


図 6 心臓形成に関わる遺伝子とカスケード



カスケードを知ることができる。Tbx 遺伝子の出現により、ほぼコンパートメント研究は理解されたように思える(図6)。では、心臓発生研究は終息を迎えるのであろうか? 逆に、次に取り組みなければならない3つの大きな課題が生まれてきた。それが、「心臓を構成する個々の心臓細胞の運命決定因子の探索」と「心臓を構成する細胞の可塑性」、そして「心臓という器官の起源の理解」であろう。本章は、まず心臓運命を司るプログラム因子について概説したい。

1. 心臓誘導因子としての BMP と WNT インヒビター

ES や iPS 細胞を分化させずに心臓に移植すると、一部心筋に分化はするが、多くの細胞は未分化性を保ちつつテラトマを形成する⁶³⁾。そのため、これらの幹細胞を効率良く正確に心臓細胞に分化させる技術の確立は再生医学において重要なテーマであり、これまで分泌性因子による心臓誘導法が開発されてきた。その中でも最重要シグナルが BMP と DKK (WNT インヒビター) であると考えられる。

P19 細胞株や ES 細胞を用いた細胞培養系では、BMP 投与により心臓初期転写因子の発現を伴う心筋誘導が引き起こされる⁶⁴⁾⁶⁵⁾。Yuasa らは BMP シグナルのアンタゴニストに着目し、分化誘導前に一度 Noggin で前処理を行った胚葉体を BMP で刺激したところ、高効率で心筋分化が引き起こされることを報告している⁶⁶⁾。ほかの BMP 阻害物質である Gremlin 処理を行っても同様の結果が得られており、分化以前に非 BMP 影響下にあることが効率良い心臓細胞への分化に重要であると考えられる⁶⁷⁾。また、P19 細胞株はレチノイン酸や TGF β 1 を投与することによっても心筋分化誘導が引き起こされる⁶⁸⁾⁶⁹⁾。

Mesp1 由来の細胞は、心筋をはじめ、骨格筋や平滑筋などに分化することから、Mesp1 系譜から心臓運命が特定されるメカニズムを理解する必要がある。カエル胚、マウス ES 細胞株、ヒト ES 細胞株を用いた一連の研究で、内胚葉に発現する Wnt インヒビターである Dkk1 が Mesp1 由来細胞へ働きかけるこ

とで、心臓へと効率良く分化することが明らかとなった⁹⁾¹⁰⁾⁷⁰⁾。ヒト ES 細胞を用いた研究においては、KDR(Flk1)^{low}/cKit⁻/DKK⁺ の細胞集団は心筋へと分化することが報告されている¹³⁾。Zhu と Shiojima らはカノニカル Wnt シグナルのインヒビターである IGFBP4 を投与することにより、P19CL6 細胞株における心筋分化誘導が通常より 10 倍高く引き起こされることを報告している⁷¹⁾。カエル胚において IGFBP4 の機能を siRNA や morpholino を用いて阻害すると心臓主要遺伝子の発現が消失するが、IGFBP4 を強制発現させても異所的な心筋誘導は引き起こせなかった。このことから、IGFBP4 は心筋分化の促進、成熟に重要な因子であると考えられる。

生体発生において Mesp1 は心臓領域形成時以前に発現が消失する。よって、Mesp1 と心臓誘導・心筋分化を引き起こす転写プログラムとの間には時空間的に大きなギャップがあり、Mesp1 シグナルのみでは説明不可能である。よって、T/Bra や Eomes などの Tbx 遺伝子も心臓誘導因子と考えられ、これらの遺伝子との関係把握も Mesp1 の機能を理解するうえで、今後の課題と考えられる⁴⁾。

さらに、BMP-DKK などの分泌因子は、微妙な濃度変化によって神経などのほかの組織細胞にも分化する可能性があることから、今後臨床応用を目指すためには、繊細な技術革新が必要である⁷²⁾。画期的な方法のひとつとして、Hattori らは分化細胞をセルソーターで再度選別することにより、純化された心筋を得る方法を開発している⁷³⁾。また、Uosaki らは、低分子化合物のスクリーニングにより VCAM1 発現細胞が効率良く心筋分化を促進することを報告している⁷⁴⁾。心臓前駆細胞や心臓幹細胞を利用することも、今後有効的であると考えられる⁶³⁾。

2. 心臓誘導因子としての転写調節因子

心臓発生に関わる転写因子を強制発現させることによって異所的に拍動する心臓を誘導しようという試みは、多くの研究者によってなされている。ゼブラ