

の発現が抑制される³⁰⁾。

また、PRC2に含まれるヒストンメチル化酵素Ezh2を心臓発生初期に特異的に欠損させたマウスでは、心室中隔欠損、心筋緻密化障害、肉柱過形成といった先天性心臓形成異常が生じ、心臓発生におけるPRC2の重要性を示唆している³¹⁾。

さらに、Ezh2はエピジェネティックな制御によりSix1の発現を抑制している³²⁾。ホメオドメイン転写因子Six1は骨格筋遺伝子の発現制御に関与し、心臓においては心臓前駆細胞では発現するが心筋分化に伴って発現が低下する。Ezh2欠損マウスでは、Six1および胎仔期遺伝子群、線維化に関わる遺伝子群の発現抑制が解除され、さらにSix1の下流にある骨格筋遺伝子群の発現が上昇し、成体において心筋細胞の肥大が引き起こされる。このことから、Ezh2のヒストン修飾を介したSix1のエピジェネティックな抑制機構は、出生後の心臓のホメオスタシスの維持に必須であり、PRC2は先天性心疾患のみならず、成人後に発症する心臓保護においても重要な機能を担う³²⁾。

② ヒストンメチル化酵素

哺乳類DOT1L (DOT1-like protein) はH3K79メチル化酵素 (H3K79me2/3) であり、酵母DOT1のホモログである (牧野・岡田の稿参照)。H3K79メチル化に関わる酵素はDOT1Lのみであり、非常に興味深い。ノックアウトマウスでは胎生致死となるが、心臓特異的に欠損させたマウスでは出生する。しかし、心腔肥大、間質性線維症の発症、心収縮不全、刺激伝導系の異常により約半数のマウスは生後2週間以内に突然死し、6カ月後にはほぼ100%の割合で死亡する。DOT1Lは筋ジストロフィー責任遺伝子の1つであるDystrophinの転写を制御し、Dot1l欠損型マウスでは筋ジストロフィーの症状の1つである拡張型心筋症と酷似した症状が認められる³³⁾。

MLL2 (mixed lineage leukemia) はH3K4のメチル化酵素であり、心臓中隔欠損を呈するKabuki症候群においてMLL2の変異が原因となることが発見された³⁴⁾³⁵⁾。MLL2のパートナー因子の1つPtipは標的遺伝子座への特異的な結合に重要であることが示唆されている。Ptipを心筋特異的に欠損させたマウスでは、成体心臓においてイオンチャネルサブユニットをコードする遺

伝子Kcnip2の発現が低下し不整脈を発症する³⁶⁾。

Whsc1 (Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1) はH3K36メチル化酵素であり、Set2ホモログの1つである。Nkx2.5; Whsc1ダブルヘテロマウスでは、シングルヘテロマウスと比較して心房心室中隔欠損の発症率が上昇することから、Whsc1はNkx2.5と連携して、H3K36メチル化を介した標的遺伝子の発現調節により、中隔形成を制御していると推測される²⁵⁾³⁷⁾。

③ ヒストン脱メチル化酵素

i) Jumonji

Jarid2/JumonjiはJmjCドメインをもつヒストン脱メチル化酵素で、Jumonjiファミリーの一種である。Jarid2欠損マウスでは、心筋の肉柱過形成、兩大血管右室起始症、神経管形成の欠損を生じる^{38)~40)}。同じくJumonjiファミリーに属するJmjd6/Ptdsr欠損マウスにおいても心室中隔欠損、肺動脈低形成、兩大血管右室起始症が認められ⁴¹⁾、これらの因子は流出路中隔形成に寄与すると考えられる。Jarid2は心内膜でNotch1および、その下流遺伝子であるNrg1の発現を抑制し、心筋肉柱形成の制御に関与する⁴²⁾。また、心内膜におけるBrg1とJarid2のバランスが、心筋肉柱形成と心内膜形成を調節する、と推測されている。

ii) Utx/Uty

ヒストンH3K27脱メチル化酵素UTXは、心臓転写因子群との会合により心臓特異的因子のエンハンサー (ANF, Baf60c enhancer) に結合して領域を脱メチル化するとともに、これらのエンハンサー上へのBrg1の結合を促進することにより、心筋特異的遺伝子の発現を促進することが報告された。UtyはY染色体上に存在するUtxのホモログである⁴³⁾。

④ ヒストンアセチル化/脱アセチル化と心筋発達

ヒストンアセチル化酵素p300欠損マウスおよび点変異体は、心筋の非薄化、肉柱低形成、心房・心室中隔欠損等を発症し、胎生致死となる⁴⁴⁾⁴⁵⁾。p300は心臓転写因子Gata4のコアクチベーターとして働き、細胞増殖に必須である⁴⁶⁾⁴⁷⁾。

ヒストン脱アセチル化酵素HDACは4つのサブファミリー (class I, II a, II b, IV) に分類され、そのなかでもclass Iに属するHdac1, Hdac2, Hdac3, class IIに属するHdac5, Hdac9が心臓の遺伝子発現を制御

することが報告されている。Hdac1とHdac2は相補的に機能し、両者を心筋特異的に欠損させたマウスでは形態は正常だが、不整脈、拡張型心筋症を発症し、生後2週間以内に死亡する⁴⁸。Hdac1、Hdac2は胎仔性カルシウムチャンネルや骨格筋特異的収縮因子の発現を抑制する⁴⁸。Hdac2/Hopは心臓転写因子SRFおよびGata4の抑制により心筋増殖を阻害する⁴⁹。Hdac3を心筋特異的に欠損させたマウスでは心肥大、脂肪酸代謝の異常が生じ、生後3~4カ月で死亡する⁵⁰。Hdac3は代謝関連遺伝子群プロモーター上でPPAR α の活性を阻害する。一方、過剰発現させたマウスでは心臓過形成となり、細胞周期阻害に関与する遺伝子発現が抑制されることが報告されている⁵¹。Hdac5およびHdac9は心発生において相補的に働き、それぞれの欠損型マウスでは表面的な異常はみられない。しかし両欠損マウスは、多くは胎性致死となり、出生後7日目までに死亡する。心室中隔欠損が認められ、いくつかの個体は心筋層の菲薄化を生じる⁵²。Hdacの減少により、心臓転写因子Mef2c、SRF、myocardin、CAMTA2の転写が促進されたことに起因すると推測されている⁵³。

3 機能性RNA分子と心発生、心疾患

① microRNA (miRNA)

近年、複数のmicroRNAが細胞分化や器官発生・機能維持の制御に重要であることが報告され、心臓においても特異な機能をもつことが多数報告されている。SRFにより誘導されるmiR-145とmiR-143は協調して平滑筋増殖に関わる転写因子群(klf4、myocardin、Elk-1)を抑制し、平滑筋細胞への分化を促進する⁵⁴。また、*in vitro*/*in vivo*において心臓転写因子3因子(Gata4、Mef2c、Tbx5)によって線維芽細胞を心筋細胞へとリプログラムすることが報告されたが⁵⁵⁻⁵⁶、miRNAにおいてもmiR-1、133、208、499の組み合わせにより線維芽細胞から心筋細胞へとリプログラムできることが報告された⁵⁷。

筋特異的なmiRNAであるmiR-1-2を欠損させたマ

ウスでは、心室中隔欠損、刺激伝導系や細胞分裂の異常など、多数の心臓発生異常を生じる⁵⁸。成体心筋に発現する α MHC遺伝子のイントロンにコードされる心臓特異的なmiR-208は骨格筋因子の発現を抑制する一方、心臓ストレスや甲状腺機能低下に反応して β MHCの発現を亢進し、ミオシン重鎖型のスイッチングに関わることも報告されている⁵⁹。

② long non-coding RNA (lncRNA)

現在、lncRNAと心臓機能に関する報告はほとんどされていない。しかし興味深いことに、Oct4やNanogなどの多能性に必須な転写因子群がlncRNAプロモーター領域へ結合することが報告され⁶⁰、また、胚性幹細胞の多分化能維持に必須なlncRNAとして数十種類のlncRNAが同定されている⁶¹。その1つであるRORはiPS細胞産生時特異的に高く発現するが、ノックダウンにより線維芽細胞からiPS細胞へのリプログラミングが阻害される⁶²。また、エンハンサー領域のChIP-seq解析により、多数の領域でlncRNAが産生されることが報告されている⁶³⁻⁶⁵。近い将来、心筋リプログラミングや心臓発生特異的エンハンサー領域におけるlncRNAの制御など、lncRNAの心臓における役割が明らかになってくるであろう。

■ おわりに

現在、先天性心疾患や成人における心疾患は高頻度で発症する重篤な疾患であり、再生し難い心臓において、いかにして心機能を維持・回復させるかは重要な課題である。今までのエピゲノム研究の多くは分子機構に重きが置かれ、器官形成(とりわけ構成細胞の運命決定)や疾患との関わりに着目した研究は少なかった。しかしながら、近年急速に明らかとなりつつある心発生のエピジェネティック制御機構の解明により、心疾患への理解が深まり、新たな治療法へと発展する時代となった。これらの心臓エピゲノム研究の成果が、基礎研究と臨床研究とを結び付けるモデルとして、他組織の発症メカニズムの解明においても端緒となることを期待したい。

文献

- 1) 森田唯加 ほか：血管医学, 13 : 97-113, 2012
- 2) 竹内 純 ほか：Annual Review 循環器 : 1-16, 2011
- 3) Lickert, H. et al. : Nature, 432 : 107-112, 2004
- 4) van Weerd, J. H. et al. : Cardiovasc. Res., 91 : 203-211, 2011
- 5) 塚原由布子 ほか：Heart View, 15 : 55-63, 2011
- 6) Chi, T. H. et al. : Nature, 418 : 195-199, 2002
- 7) Indra, A. K. et al. : Development, 132 : 4533-4544, 2005
- 8) Ho, L. & Crabtree, G. R. : Nature, 463 : 474-484, 2010
- 9) Wang, W. et al. : Genes Dev., 10 : 2117-2130, 1996
- 10) Martens, J. A. & Winston, F. : Curr. Opin. Genet. Dev., 13 : 136-142, 2003
- 11) Delgado-Olguín, P. et al. : Scientific World Journal, 6 : 1851-1861, 2006
- 12) Takeuchi, J. K. et al. : Nat. Commun., 2 : 187, 2011
- 13) Lou, X. et al. : Development, 138 : 3113-3123, 2011
- 14) Hang, C. T. et al. : Nature, 466 : 62-67, 2010
- 15) Takeuchi, J. K. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104 : 846-851, 2007
- 16) Davis, R. L. et al. : Cell, 51 : 987-1000, 1987
- 17) Wang, Z. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100 : 7129-7134, 2003
- 18) Takeuchi, J. K. & Bruneau, B. G. : Nature, 459 : 708-711, 2009
- 19) Stopka, T. & Skoultschi, A. I. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100 : 14097-14102, 2003
- 20) Yoshimura, K. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106 : 9280-9285, 2009
- 21) Bajpai, R. et al. : Nature, 463 : 958-962, 2010
- 22) Randall, V. et al. : J. Clin. Invest., 119 : 3301-3310, 2009
- 23) Lu, J. et al. : PLoS One, 4 : e5577, 2009
- 24) Koshiba-Takeuchi, K. et al. : Nat. Genet., 38 : 175-183, 2006
- 25) Nimura, K. et al. : Nature, 460 : 287-291, 2009
- 26) Jónsson, Z. O. et al. : J. Biol. Chem., 276 : 16279-16288, 2001
- 27) Rottbauer, W. et al. : Cell, 111 : 661-672, 2002
- 28) Shirai, M. et al. : J. Clin. Invest., 110 : 177-184, 2002
- 29) Takihara, Y. et al. : Development, 124 : 3673-3682, 1997
- 30) Kang, X. et al. : Mol. Cell, 38 : 191-201, 2010
- 31) He, A. et al. : Circ. Res., 110 : 406-415, 2012
- 32) Delgado-Olguín, P. et al. : Nat. Genet., 44 : 343-347, 2012
- 33) Nguyen, A. T. et al. : Genes Dev., 25 : 263-274, 2011
- 34) Ng, S. B. et al. : Nat. Genet., 42 : 790-793, 2010
- 35) Digilio, M. C. et al. : Am. J. Med. Genet., 100 : 269-274, 2001
- 36) Stein, A. B. et al. : J. Clin. Invest., 121 : 2641-2650, 2011
- 37) Bergemann, A. D. et al. : Trends Genet., 21 : 188-195, 2005
- 38) Lee, Y. et al. : Circ. Res., 86 : 932-938, 2000
- 39) Jung, J. et al. : Dev. Dyn., 232 : 21-32, 2005
- 40) Takeuchi, T. et al. : Mech. Dev., 86 : 29-38, 1999
- 41) Schneider, J. E. et al. : BMC Dev. Biol., 4 : 16, 2004
- 42) Mysliwiec, M. R. et al. : J. Biol. Chem., 286 : 17193-17204, 2011
- 43) Lee, S. et al. : Dev. Cell, 22 : 25-37, 2012
- 44) Yao, T. P. et al. : Cell, 93 : 361-372, 1998
- 45) Shikama, N. et al. : EMBO J., 22 : 5175-5185, 2003
- 46) Yanazume, T. et al. : Mol. Cell Biol., 23 : 3593-3606, 2003
- 47) Gusterson, R. J. et al. : J. Biol. Chem., 278 : 6838-6847, 2003
- 48) Montgomery, R. L. et al. : Genes Dev., 21 : 1790-1802, 2007
- 49) Trivedi, C. M. et al. : Dev. Cell, 19 : 450-459, 2010
- 50) Montgomery, R. L. et al. : J. Clin. Invest., 118 : 3588-3597, 2008
- 51) Trivedi, C. M. et al. : J. Biol. Chem., 283 : 26484-26489, 2008
- 52) Chang, S. et al. : Mol. Cell Biol., 24 : 8467-8476, 2004
- 53) Song, K. et al. : Cell, 125 : 453-466, 2006
- 54) Cordes, K. R. et al. : Nature, 460 : 705-710, 2009
- 55) Ieda, M. et al. : Cell, 142 : 375-386, 2010
- 56) Qian, L. et al. : Nature, 485 : 593-598, 2012
- 57) Jayawardena, T. M. et al. : Circ. Res., 110 : 1465-1473, 2012
- 58) Zhao, Y. et al. : Cell, 129 : 303-317, 2007
- 59) van Rooij, E. et al. : Science, 316 : 575-579, 2007
- 60) Sheik Mohamed, J. et al. : RNA, 16 : 324-337, 2010
- 61) Guttman, M. et al. : Nature, 477 : 295-300, 2011
- 62) Loewer, S. et al. : Nat. Genet., 42 : 1113-1117, 2010
- 63) Orom, U. A. et al. : Cell, 143 : 46-58, 2010
- 64) Kim, T. K. et al. : Nature, 465 : 182-187, 2010
- 65) Ounzain, S. et al. : Biochim. Biophys. Acta, in press (2012)

Profile

著者プロフィール

中村 遼：2011年、立教大学理学部卒業。同年4月より東京大学大学院理学系研究科へ入学。現在修士2年。エピゲノム研究と心臓発生研究の奥深さに魅せられ、心臓における新規のエピゲノム制御機構を解明したい、と考えている。バイオリン、パイプオルガンを弾ける週末が最高なりフレッシュ日。

塚原由布子：2005年、東京理科大学薬学部卒業。11年、東京大学大学院理学系研究科（宮島 篤教授）にて学位取得。同年より、東京大学分子細胞生物学研究所にて特任研究員として勤務。心臓細胞の運命決定に関わる特定因子の探索と、その制御メカニズムの解明をめざしています。娘と研究者の夫に励まされ、奮闘しつつも楽しく研究しています。

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た。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

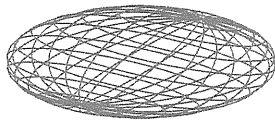
が明らかとなってきた。

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が存在することが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

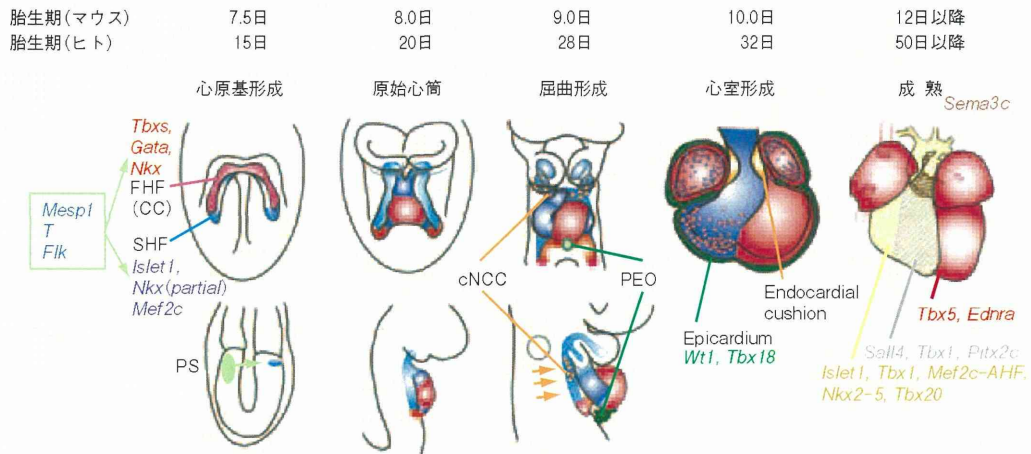
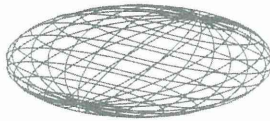


図1 哺乳類(マウス・ヒト)における心臓発生と心臓区画化形成因子
(塚原由布子, 小柴和子, 竹内 純: 心臓発生にかかわるクロマチン・ヒストン制御の役割. Heart View 15: 55-63, 2011)

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日目までには、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との協同的作用により、心室中隔形成に深く関わっている³⁵⁾³⁶⁾が、

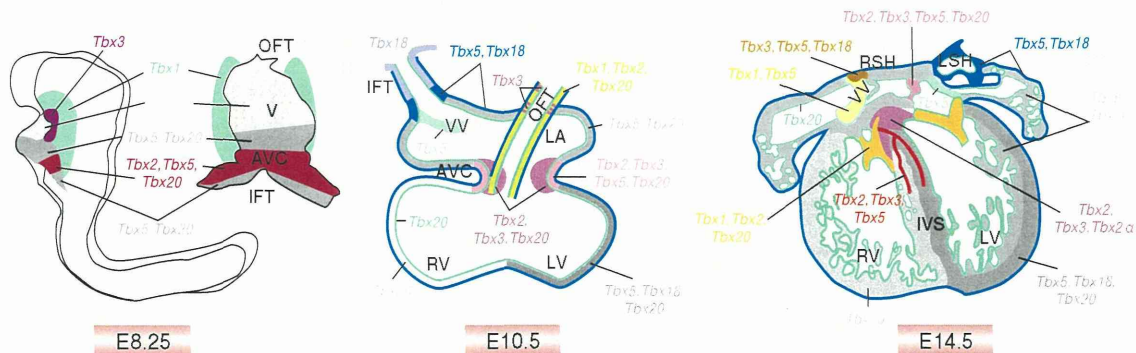


図2 心臓区画形成に関わるTbx 遺伝子群

(文献29より引用)

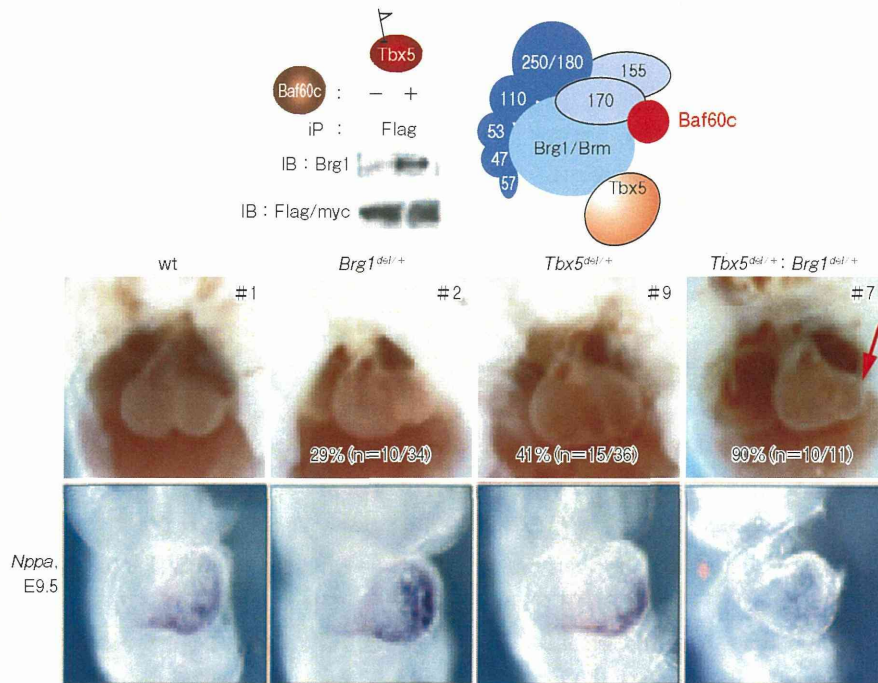
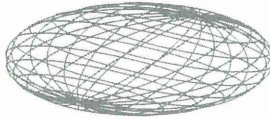


図3 先天的左室低形成疾患はエピジェネティック因子の発現量によって重篤化される

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、このようなハ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

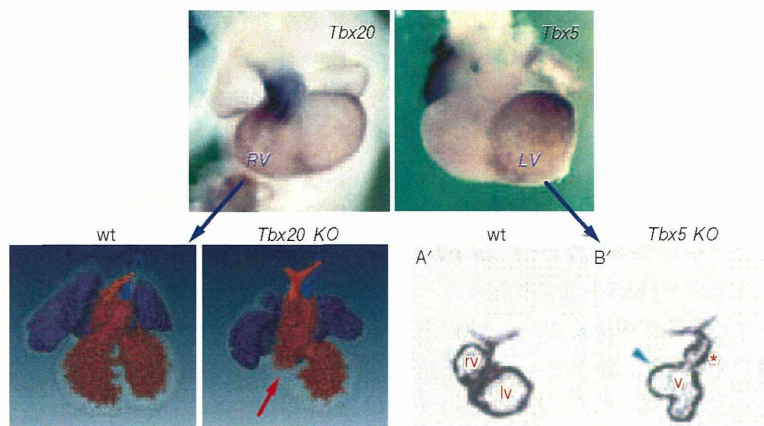


図4 左室形成因子としての Tbx5 と右室形成因子としての Tbx20

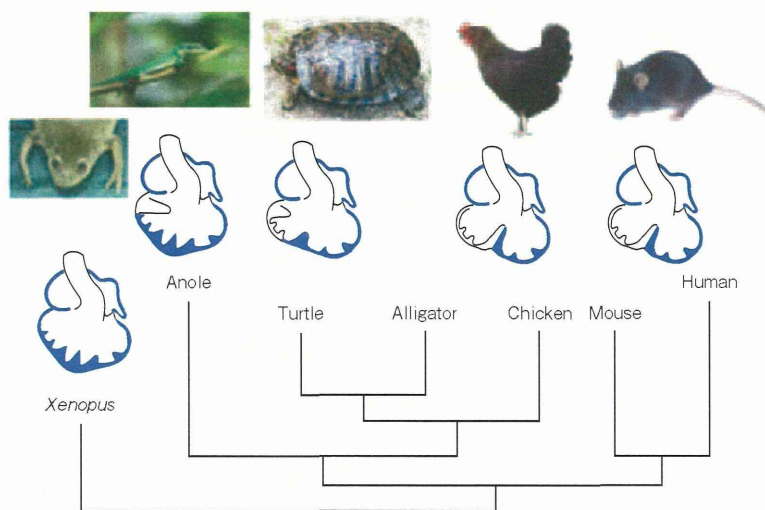
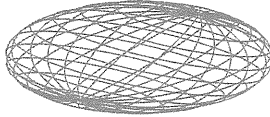


図5 各脊椎動物胚における Tbx5 遺伝子の発現様式の相違と心形態との相関性

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限局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⁴⁰⁾。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、初期心臓発生に必須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又心臓が形成され、胚性 8.5~9.0 日目で致死となる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須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-

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され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

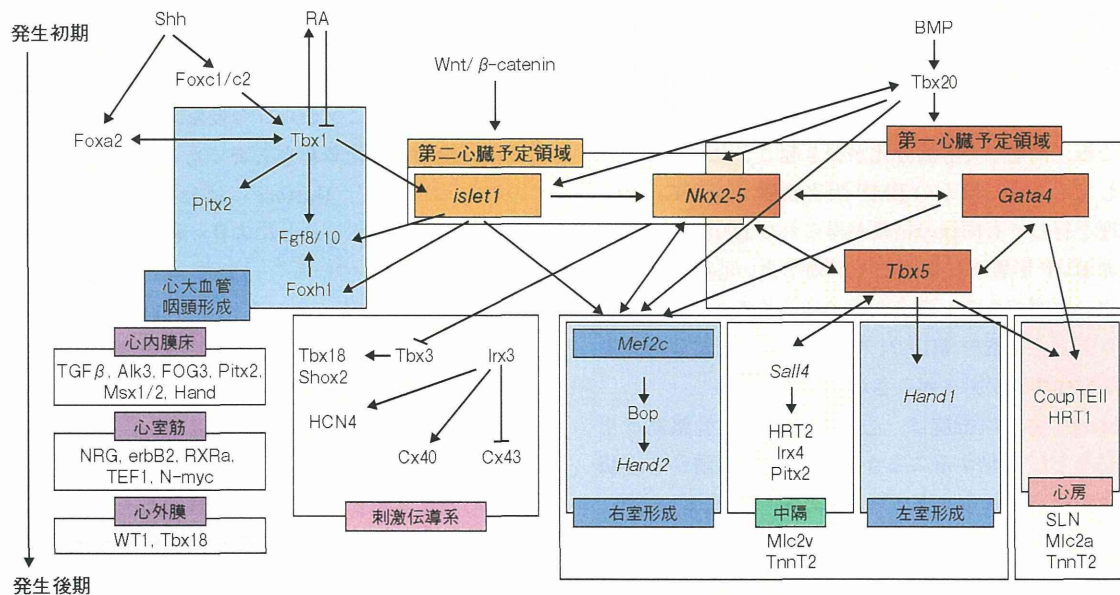
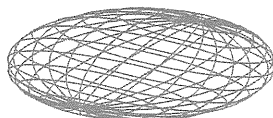


図 6 心臓形成に関わる遺伝子とカスケード



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、次に取り組まなければならない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ーマを形成する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⁶⁵⁾⁶⁹⁾。

Mespl 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、Mespl 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 Mespl 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¹⁵⁾。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 Mespl は心臓領域形成時以前に発現が消失する。よって、Mespl 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、Mespl 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 Mespl 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⁶⁸⁾。

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

フィッシュ胚においてはGata5を、カエル胚においてはGata4を強制発現させることにより、Nkx2-5が異所的に誘導され心筋誘導が引き起こされる⁽⁷⁵⁾⁽⁷⁶⁾。しかしながら、Gata遺伝子は内胚葉においても機能しており、二次的な前後軸を形成することによって心臓領域が形成された結果と考えられている。HLH型転写因子Myocardinをカエル胚に導入することによって、 α 型心アクチンが誘導されるが、Myocardinのみでは拍動する心筋は得られず、むしろ平滑筋分化を促進することが明らかとなった⁽⁶¹⁾⁽⁶²⁾。 β -cateninを内胚葉特異的に遺伝子破壊すると、Nkx2-5陽性の心臓領域が亢進されるが、この場合でも拍動心筋は見受けられない⁽⁷⁷⁾。ニワトリ胚でTbx5を強制発現させても異所的な心臓誘導は引き起こされず、Tbx5の発現領域に依存して心室中隔の形成位置がシフトする⁽⁴⁰⁾。また、より早期のカエル胚にTbx5を強制発現しても異所的な心筋誘導は引き起こされないが、正常よりかなり早期に心筋収縮因子のひとつTトロポミオシンの誘導を引き起こすことから、心筋誘導促進因子と考え

られる⁽⁷⁸⁾。興味深いことに、HiroiらはTbx5とNkx2-5、YamadaらはNkx2-5とGata4の組み合わせで、P19細胞株またはマウスES細胞における心筋分化が促進されると報告している。このことから、Tbx5、Nkx2-5、Gata4は心筋の必須因子であると予測される⁽⁷⁹⁾。

3. 心筋マスター因子としての機能複合体

さまざまなシグナルを受け、特異な遺伝子発現のもと、心臓細胞に限らず、特殊な細胞が派生する(図7)。図7のように、心臓は心筋だけではなく非常に多くの細胞から構成されている。これらの細胞は分泌性因子によって一同に誘導が引き起こされることが明らかになっている。つまり、心筋誘導とともに刺激伝導系や心臓平滑筋も誘導されてくる。臨床応用を考えるうえで重要なことは心室筋と心房筋の分化制御機構の解明であろうが、まだ詳細には明らかにされていない。よって、心筋分化のみならず、すべての構成細胞の分化調節機構を理解していかないといけない。

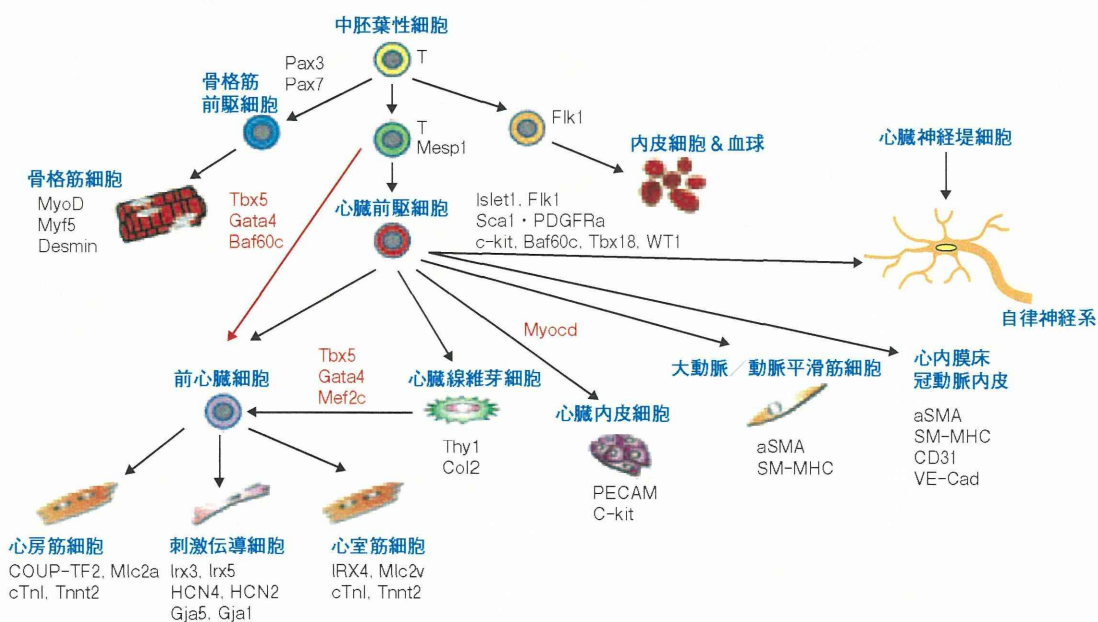


図7 心臓を構成する細胞特異的な遺伝子発現

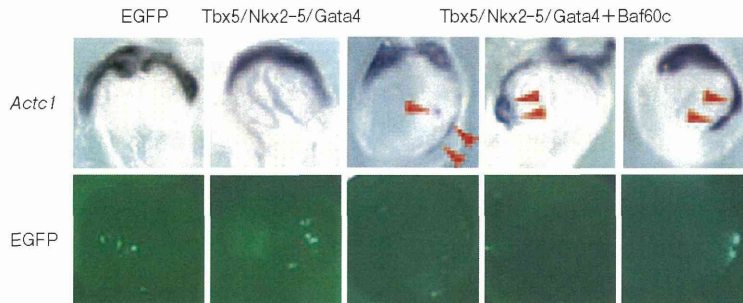
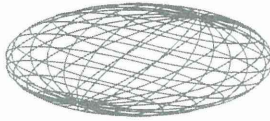


図8 マウス胚強制発現系を用いた異所的な α 心アクチンの誘導
(文献80より引用)

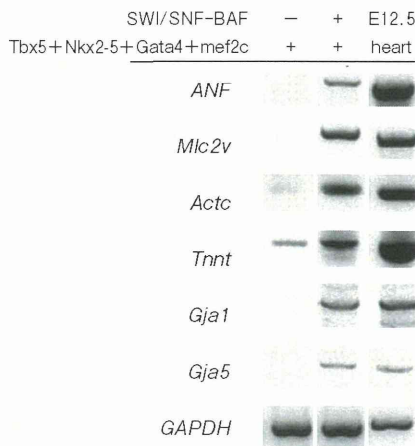


図9 10T1/2細胞を用いた心臓因子の誘導
(文献80より引用)

筆者のグループは、心臓転写因子を組み合わせ強制発現させることで心筋誘導を試みたが、不可能であった(図8, 9)。筆者らは、転写因子が機能するうえでクロマチン構造状態が重要な鍵を担っていると考え、初期心臓発生時期に心臓領域特異的に発現するクロマチン関連因子を探索したところ、SWI/SNFクロマチンリモデリング複合体が心発生に重要である知見を得ていた⁴⁵⁾。そこで、上記心臓転写因子にSWI/SNFクロマチンリモデリング複合体の一因子であるBaf60cを加えマウス胚中胚葉性細胞に強制発現させると、異所的に α 心アクチン陽性の拍動する心筋が得られることを明らかにした(図8, 9)⁸⁰⁾。さらに、SWI/SNF-

BAF60c複合体は、心臓転写因子Tbx5, Nkx2-5, Gata4, RBPjkと蛋白質間で強固に会合して下流の遺伝子発現制御を担っていることと、クロマチン因子に変異が生じるとマウスやヒトの心機能において異常が生じることからも、Baf60cはクロマチン構造を紐解くだけでなく、特定遺伝子と相乗的に作用することによって細胞構成を決定付けていると考えられる⁸¹⁾⁻⁸⁴⁾。

心臓再生とリプログラミング因子

心筋は、一度損傷を受けると再生が不可能であるため、心機能の低下は直接個体の死に直結すると考えられていた。しかし、2011年のScience誌に、マウス新生仔7日目以前なら心臓再生は可能であることが報告された⁸⁵⁾。さらに、放射性同位体C14のラベルを指標にして、ヒトの心筋のうち平均1%が1年間でリニューアルされているという報告もされた⁸⁶⁾。このように、限定的ではあるが哺乳類の心臓でも可塑性は保たれているのである。心臓再生が引き起こされる際に重要な現象としては、心筋の脱分化と増殖心筋への再分化と血管新生であろう。ゼブラフィッシュを用いた結果では、心筋は前駆細胞レベルまでいったん細胞運命が巻き戻った後、再度増殖し心筋へと分化していく⁸⁷⁾。この現象はゼブラフィッシュのみならず、心臓再生可能な生物共通の現象であることがわれわれの結

果からも示されている(投稿中)。

しかし、心筋梗塞はヒト心疾患の中でも急を要するものである。この際、心筋は壊死し線維芽細胞に場所を取って替わられる。この線維芽細胞を心筋にする研究、つまり、ほかの体細胞を心筋細胞へとリプログラムさせ移植することによる、心機能向上を目指した手法が盛んに研究されている。2010年には、*in vitro* の系において3因子(Gata4, Mef2c, Tbx5)によって線維芽細胞を心筋細胞へとリプログラムさせることに成功している⁸⁸⁾。2012年には、同3因子によって*in vivo* の系においてもリプログラムされることが明らかになり、さらには心筋梗塞マウスの心機能を向上させることが示された。同年、これら3因子(Gata4, Mef2c, Tbx5)に加え、胎児性遺伝子 Hand2 を加えた4因子によって生体内外いずれにおいても、より高効率に心筋細胞へとリプログラムされることが報告された⁸⁹⁾⁹⁰⁾。

また、リプログラムに寄与するのは転写因子だけでなく、同年に3種類のmiRNAによっても線維芽細胞から心筋へとリプログラムされることが示された⁹¹⁾。これらのことから、今後いかに心筋へと効率良くリプログラムさせ、損傷を受けた領域を正常に整えることができるかが、リプログラムという手法を細胞医療に用いるための鍵となると考えられる。また、心臓が再生するうえで血管新生が重要であると考えられるが、現段階では、血管と心筋の双方の観点からみた心臓再生メカニズムについては不明な点が多い。

以上をまとめると、心筋が誘導される機序および、それらによって引き起こされる生体心臓でのダイナミクスな変化に目を向ける必要があると言える。

最後に：残された課題

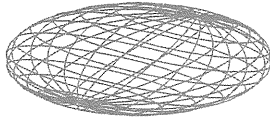
心臓発生研究はされ尽くされた感があるのは否めない。しかし、今までの研究は大きな枠組みを理解してきただけである。これらの研究結果があつてこそ、よ

うやく心臓発生研究は本来のなすべき方向が見えてきたと考えられる。

今後将来にわたって、心臓発生学が取り組んでいくべきテーマは、大きく3つある。1つ目は、心臓を構成する個々の細胞の由来と分化制御機構である。細胞を「作る」「育てる」「熟成させる」ことが、これからの心臓発生研究の中心になってくると考えている。2つ目は、心臓細胞の可塑的な作用である。心臓はもはや終末像ではなく、まだ再生の余地のある可塑性を持った器官であることが理解されつつある。この可塑的機能を引き出す=再生向上に関わる因子を見出すことが課題となってくる。もちろん、エピジェネティック因子の機能に目を向けることも重要であろうが、この際に今までの器官発生・再生研究が非常に良いテキストとなるに違いない。そして、どの細胞がより可塑性を保っているのか、最新機器を駆使すれば理解されると考えられる。3つ目は、性差による細胞分化の相違であろうと、筆者は考えている。この3つに共通するのは「細胞」であり、ヒトの社会と同じ、心臓を構成する細胞社会を知ることが、これからの心臓発生学の焦点である。

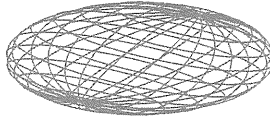
References

- 1) Lawson KA, Meneses JJ, Pedersen RA : Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development* 113 : 891-911, 1991
- 2) Tam PP, Parameswaran M, Kinder SJ, Weinberger RP : The allocation of epiblast cells to the embryonic heart and other mesodermal lineages : the role of ingression and tissue movement during gastrulation. *Development* 124 : 1631-1642, 1997
- 3) Kirby M : Cardiac Development. Oxford University Press, Oxford, 2007
- 4) Costello I, Pimeisl IM, Dräger S, et al : The T-box transcription factor Eomesodermin acts upstream of *Mespl* to specify cardiac mesoderm during mouse gastrulation. *Nat Cell Biol* 13 : 1084-1091, 2011
- 5) David R, Jarsch VB, Schwarz F, et al : Induction of *MesP1* by Brachyury (T) generates the common multipotent cardiovascular stem cell. *Cardiovasc Res* 92 : 115-122, 2011



- 6) Lindsley RC, Gill JG, Kyba M, et al : Canonical Wnt signaling is required for development of embryonic stem cell-derived mesoderm. *Development* **133** : 3787-3796, 2006
- 7) Saga Y, Miyagawa-Tomita S, Takagi A, et al : MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development* **126** : 3437-3447, 1999
- 8) Saga Y, Kitajima S, Miyagawa-Tomita S : Mespl expression is the earliest sign of cardiovascular development. *Trends Cardiovasc Med* **10** : 345-352, 2000
- 9) Lindsley RC, Gill JG, Murphy TL, et al : Mespl coordinately regulates cardiovascular fate restriction and epithelial-mesenchymal transition in differentiating ESCs. *Cell Stem Cell* **3** : 55-68, 2008
- 10) David R, Brenner C, Stieber J, et al : MesP1 drives vertebrate cardiovascular differentiation through Dkk-1-mediated blockade of Wnt-signalling. *Nat Cell Biol* **10** : 338-345, 2008
- 11) Kattman SJ, Huber TL, Keller GM : Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Dev Cell* **11** : 723-732, 2006
- 12) Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, et al : Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* **408** : 92-96, 2000
- 13) Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, et al : Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature* **453** : 524-528, 2008
- 14) Srivastava D : Making or breaking the heart : from lineage determination to morphogenesis. *Cell* **126** : 1037-1048, 2006
- 15) 竹内 純, Bruneau BG : 分子生物学的な視点から心臓発生と疾患のメカニズムを紐解く—クロマチンリモデリングファクターとモディファイケーションファクター. *細胞工学* **26** : 799-805, 2007
- 16) Vincent SD, Buckingham ME : How to make a heart : the origin and regulation of cardiac progenitor cells. *Curr Top Dev Biol* **90** : 1-41, 2010
- 17) Bruneau BG : Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis. *Circ Res* **90** : 509-519, 2002
- 18) Kelly RG, Brown NA, Buckingham ME : The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev Cell* **1** : 435-440, 2001
- 19) Mjaatvedt CH, Nakaoka T, Moreno-Rodriguez R, et al : The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field. *Dev Biol* **238** : 97-109, 2001
- 20) Waldo KL, Kumiski DH, Wallis KT, et al : Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development* **128** : 3179-3188, 2001
- 21) Cai CL, Liang X, Shi Y, et al : Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell* **5** : 877-889, 2003
- 22) Brade T, Gessert S, Kühl M, Pandur P. The amphibian second heart field : *Xenopus islet-1* is required for cardiovascular development. *Dev Biol* **311** : 297-310, 2007
- 23) Zhou Y, Cashman TJ, Nevis KR, et al : Latent TGF- β binding protein 3 identifies a second heart field in zebrafish. *Nature* **474** : 645-648, 2011
- 24) Hutson MR, Kirby ML : Model systems for the study of heart development and disease. Cardiac neural crest and conotruncal malformations. *Semin Cell Dev Biol* **18** : 101-110, 2007
- 25) Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, et al : Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* **3** : 778-784, 2001
- 26) Fernandes KJ, McKenzie IA, Mill P, et al : A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol* **6** : 1082-1093, 2004
- 27) Yoshida S, Shimmura S, Nagoshi N, et al : Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea. *Stem Cells* **24** : 2714-2722, 2006
- 28) Tamura Y, Matsumura K, Sano M, et al : Neural crest-derived stem cells migrate and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31** : 582-589, 2011
- 29) Greulich F, Rudat C, Kispert A : Mechanisms of T-box gene function in the developing heart. *Cardiovasc Res* **91** : 212-222, 2011
- 30) Xu H, Morishima M, Wylie JN, et al : Tbx1 has a dual role in the morphogenesis of the cardiac outflow tract. *Development* **131** : 3217-3227, 2004
- 31) Kraus F, Haenig B, Kispert A : Cloning and expression analysis of the mouse T-box gene Tbx18. *Mech Dev* **100** : 83-86, 2001
- 32) Mommersteeg MT, Domínguez JN, Wiese C, et al :

- The sinus venosus progenitors separate and diversify from the first and second heart fields early in development. *Cardiovasc Res* **87** : 92-101, 2010
- 33) Grieskamp T, Rudat C, Lüdtke TH, et al : Notch signaling regulates smooth muscle differentiation of epicardium-derived cells. *Circ Res* **108** : 813-823, 2011
 - 34) Bruneau BG, Logan M, Davis N, et al : Chamber-specific cardiac expression of Tbx5 and heart defects in Holt-Oram syndrome. *Dev Biol* **211** : 100-108, 1999
 - 35) Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, et al : A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell* **106** : 709-721, 2001
 - 36) Koshiba-Takeuchi K, Takeuchi JK, Arruda EP, et al : Cooperative and antagonistic interactions between Sall4 and Tbx5 pattern the mouse limb and heart. *Nat Genet* **38** : 175-183, 2006
 - 37) Takeuchi JK, Mileikovskaia M, Koshiba-Takeuchi K, et al : Tbx20 dose-dependently regulates transcription factor networks required for mouse heart and motoneuron development. *Development* **132** : 2463-2474, 2005
 - 38) Delgado-Olguín P, Takeuchi JK, Bruneau BG : Chromatin modification and remodeling in heart development. *Scientific World Journal* **6** : 1851-1861, 2006
 - 39) van Weerd JH, Koshiba-Takeuchi K, Kwon C, Takeuchi JK : Epigenetic factors and cardiac development. *Cardiovasc Res* **91** : 203-211, 2011
 - 40) Takeuchi JK, Ohgi M, Koshiba-Takeuchi K, et al : Tbx5 specifies the left/right ventricles and ventricular septum position during cardiogenesis. *Development* **130** : 5953-5964, 2003
 - 41) Koshiba-Takeuchi K, Mori AD, Kaynak BL, et al : Reptilian heart development and the molecular basis of cardiac chamber evolution. *Nature* **461** : 95-98, 2009
 - 42) Lyons I, Parsons LM, Hartley L, et al : Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5. *Genes Dev* **9** : 1654-1666, 1995
 - 43) Mommersteeg MT, Hoogaars WM, Prall OW, et al : Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. *Circ Res* **100** : 354-362, 2007
 - 44) Hoogaars WM, Engel A, Brons JF, et al : Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria. *Genes Dev* **21** : 1098-1112, 2007
 - 45) Ferdous A, Caprioli A, Iacovino M, et al : Nkx2-5 transactivates the Ets-related protein 71 gene and specifies an endothelial/endocardial fate in the developing embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106** : 814-819, 2009
 - 46) Hiroi Y, Kudoh S, Monzen K, et al : Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nat Genet* **28** : 276-280, 2001
 - 47) Garg V, Kathiriya IS, Barnes R, et al : GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature* **424** : 443-447, 2003
 - 48) Lickert H, Takeuchi JK, Von Both I, et al : Baf60c is essential for function of BAF chromatin remodelling complexes in heart development. *Nature* **432** : 107-112, 2004
 - 49) Molkentin JD : The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* **275** : 38949-38952, 2000
 - 50) Zhao R, Watt AJ, Battle MA, et al : Loss of both GATA4 and GATA6 blocks cardiac myocyte differentiation and results in acardia in mice. *Dev Biol* **317** : 614-619, 2008
 - 51) Rosenthal N, Harvey RP eds : Heart Development and Regeneration, Vol 2. Academic Press, UK, 2010
 - 52) Lin Q, Schwarz J, Bucana C, Olson EN : Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science* **276** : 1404-1407, 1997
 - 53) Bi W, Drake CJ, Schwarz JJ : The transcription factor MEF2C-null mouse exhibits complex vascular malformations and reduced cardiac expression of angiopoietin 1 and VEGF. *Dev Biol* **211** : 255-267, 1999
 - 54) Dodou E, Verzi MP, Anderson JP, et al : Mef2c is a direct transcriptional target of ISL1 and GATA factors in the anterior heart field during mouse embryonic development. *Development* **131** : 3931-3942, 2004
 - 55) von Both I, Silvestri C, Erdemir T, et al : Foxh1 is essential for development of the anterior heart field. *Dev Cell* **7** : 331-345, 2004
 - 56) Miano JM, Ramanan N, Georger MA, et al : Restrict-



- ed inactivation of serum response factor to the cardiovascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** : 17132-17137, 2004
- 57) Parlakian A, Tuil D, Hamard G, et al : Targeted inactivation of serum response factor in the developing heart results in myocardial defects and embryonic lethality. *Mol Cell Biol* **24** : 5281-5289, 2004
- 58) Niu Z, Yu W, Zhang SX, et al : Conditional mutagenesis of the murine serum response factor gene blocks cardiogenesis and the transcription of downstream gene targets. *J Biol Chem* **280** : 32531-32538, 2005
- 59) Niu Z, Iyer D, Conway SJ, et al : Serum response factor orchestrates nascent sarcomerogenesis and silences the biomineralization gene program in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105** : 17824-17829, 2008
- 60) Wang D, Chang PS, Wang Z, et al : Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell* **105** : 851-862, 2001
- 61) Small EM, Warkman AS, Wang DZ, et al : Myocardin is sufficient and necessary for cardiac gene expression in *Xenopus*. *Development* **132** : 987-997, 2005
- 62) Lin L, Cui L, Zhou W, et al : Beta-catenin directly regulates *Islet1* expression in cardiovascular progenitors and is required for multiple aspects of cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** : 9313-9318, 2007
- 63) Moretti A, Bellin M, Jung CB, et al : Mouse and human induced pluripotent stem cells as a source for multipotent *Isl1*⁺ cardiovascular progenitors. *FASEB J* **24** : 700-711, 2010
- 64) Kawai T, Takahashi T, Esaki M, et al : Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2. *Circ J* **68** : 691-702, 2004
- 65) Monzen K, Shiojima I, Hiroi Y, et al : Bone morphogenetic proteins induce cardiomyocyte differentiation through the mitogen-activated protein kinase kinase kinase TAK1 and cardiac transcription factors *Csx/Nkx-2.5* and *GATA-4*. *Mol Cell Biol* **19** : 7096-7105, 1999
- 66) Yuasa S, Itabashi Y, Koshimizu U, et al : Transient inhibition of BMP signaling by *Noggin* induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **23** : 607-611, 2005
- 67) Kami D, Shiojima I, Makino H, et al : Gremlin enhances the determined path to cardiomyogenesis. *PLoS One* **11** : e2407, 2008
- 68) Wobus AM, Kaomei G, Shan J, et al : Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* **29** : 1525-1539, 1997
- 69) Lim JY, Kim WH, Kim J, Park SI : Involvement of TGF-beta1 signaling in cardiomyocyte differentiation from P19CL6 cells. *Mol Cells* **24** : 431-436, 2007
- 70) Bondue A, Lapouge G, Paulissen C, et al : *Mesp1* acts as a master regulator of multipotent cardiovascular progenitor specification. *Cell Stem Cell* **3** : 69-84, 2008
- 71) Zhu W, Shiojima I, Ito Y, et al : IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis. *Nature* **454** : 345-349, 2008
- 72) Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, et al : *Noggin* antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* **28** : 713-726, 2000
- 73) Hattori F, Chen H, Yamashita H, et al : Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes. *Nat Methods* **7** : 61-66, 2010
- 74) Uosaki H, Fukushima H, Takeuchi A, et al : Efficient and scalable purification of cardiomyocytes from human embryonic and induced pluripotent stem cells by VCAM1 surface expression. *PLoS One* **6** : e23657, 2011
- 75) Reiter JF, Alexander J, Rodaway A, et al : *Gata5* is required for the development of the heart and endoderm in zebrafish. *Genes Dev* **13** : 2983-2995, 1999
- 76) Latinkic BV, Kotecha S, Mohun TJ : Induction of cardiomyocytes by *GATA4* in *Xenopus* ectodermal explants. *Development* **130** : 3865-3876, 2003
- 77) Lickert H, Kutsch S, Kanzler B, et al : Formation of multiple hearts in mice following deletion of beta-catenin in the embryonic endoderm. *Dev Cell* **3** : 171-181, 2002
- 78) Goetz SC, Brown DD, Conlon FL : *TBX5* is required for embryonic cardiac cell cycle progression. *Development* **133** : 2575-2584, 2006
- 79) Yamada Y, Sakurada K, Takeda Y, et al : Single-cell-derived mesenchymal stem cells overexpressing *Csx/Nkx2.5* and *GATA4* undergo the stochastic cardiomyogenic fate and behave like transient am-

- plifying cells. *Exp Cell Res* **313** : 698-706, 2007
- 80) Takeuchi JK, Bruneau BG : Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors. *Nature* **459** : 708-711, 2009
- 81) Takeuchi JK, Lickert H, Bisgrove BW, et al : Baf60c is a nuclear Notch signaling component required for the establishment of left-right asymmetry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** : 846-851, 2007
- 82) Zhu Y, Gramolini AO, Walsh MA, et al : Tbx5-dependent pathway regulating diastolic function in congenital heart disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105** : 5519-5524, 2008
- 83) Hang CT, Yang J, Han P, et al : Chromatin regulation by Brg1 underlies heart muscle development and disease. *Nature* **466** : 62-67, 2010
- 84) Takeuchi JK, Lou X, Alexander JM, et al : Chromatin remodelling complex dosage modulates transcription factor function in heart development. *Nat Commun* **187** : 2011
- 85) Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, et al : Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* **331** : 1078-1080, 2011
- 86) Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al : Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* **324**, 98-102, 2009
- 87) Lepilina A, Coon AN, Kikuchi K, et al : A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell* **127** : 607-619, 2006
- 88) Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al : Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* **142** : 375-386, 2010
- 89) Qian L, Huang Y, Spencer CI, et al : In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature* **485** : 593-598, 2012
- 90) Song K, Nam YJ, Luo X, et al : Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature* **485** : 599-604, 2012
- 91) Jayawardena TM, Egemnazarov B, Finch EA, et al : MicroRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ Res* **110** : 1465-1473, 2012