

論 文 内 容 要 旨

心臓静脈極に存在し右心室以外に寄与する
心臓前駆細胞の解析

主指導教員：吉栖 正生 教授

(基礎生命科学部門 心臓血管生理医学)

副指導教員：浅野 知一郎 教授

(基礎生命科学部門 医化学)

副指導教員：小久保 博樹 講師

(基礎生命科学部門 心臓血管生理医学)

藤井 雅行

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

ヒトの心臓は自己修復能力が乏しいため、高血圧や心筋梗塞などによって心筋細胞に傷害が起こると線維化や心肥大といった代償的な変化を経て心不全に陥る。心不全の新たな治療法としては、心筋組織を移植することによって心機能を回復させる試みがなされているが、実用化には至っていない。特に ES 細胞や iPS 細胞から心筋細胞を誘導する技術が確立されつつあるが、心房や心室、洞房結節など、各心筋細胞特異的な形質を持つ細胞に分化させる技術は確立されていない。このような各種心筋細胞誘導技術の確立のためには、心筋の前駆細胞の存在を明らかにし、その性質をより詳細に解析する必要がある。

これまで心臓は、cardiac crescent または一次心臓領域 (FHF) と呼ばれる一種類の細胞集団から形成されると考えられていた。しかし近年、二次心臓領域 (SHF) と呼ばれる心臓前駆細胞の発見によって二つの異なる性質をもつ細胞集団から心臓が形成されると考えられるようになってきた。これらの二種類の前駆細胞はそれぞれ異なるタイミングで分化し、ダイナミックな形態的变化を遂げて心臓に寄与するが、特に FHF に関しては、その前駆細胞が特定されていない。

本研究では Wnt シグナルの抑制因子である Secreted frizzled-related protein (Sfrp)-5 に着目し、その遺伝子発現や系譜解析によって、右心室以外の全ての心臓領域に寄与する新たな心臓前駆細胞を見いだした。Sfrp5 は、胎生 (E) 7.5 日目に *Nkx2.5* や *Mlc2a* といった心筋分化マーカーを発現する cardiac crescent の外側に発現し、その後心臓の静脈極の間葉系細胞に発現するが、E10.5 日以降になると *TnT* や *Hcn4* を共発現するようになり、静脈洞心筋細胞へと分化することが示された。この観察結果から、これまで E9.0 日以前には同定されていなかった静脈洞の前駆細胞に Sfrp5 が発現している可能性が考えられた。そこで、Sfrp5-Cre および Sfrp5-Ert2Cre ノックイン (KI) マウスを作製し、Sfrp5 発現細胞の系譜解析を行ったところ、Sfrp5 を発現した細胞が静脈洞だけでなく左心室、流出路、心房の全ての心筋細胞に寄与するが、右心室にはほとんど寄与しないことが明らかになった。この結果から Sfrp5 発現細胞は、左心室、流出路、心房、静脈洞の共通の前駆細胞であると考えられた。ほ乳類や鳥類など進化的に高等な脊椎動物において右心室は心室中隔によって左心室と完全に分離されていることから、Sfrp5 発現細胞は右心室獲得以前の下等な脊椎動物にも共通する心臓前駆細胞である可能性が考えられた。

次に、Sfrp5 を発現する心臓前駆細胞と従来の心臓形成に寄与することが知られる FHF や SHF との関係性について解析した。FHF の遺伝子マーカーとして

Tbx5 と *Hcn4* を、SHF の遺伝子マーカーとして *Isl1* を用いて *Sfrp5* の発現領域や細胞系譜と比較したところ、*Sfrp5* の発現は E7.5-9.5 日の間、主に *Tbx5*⁺/*Hcn4*/*Isl1*⁻ の細胞であるが、その細胞系譜は *Hcn4*⁺ である FHF や、*Isl1*⁺ の臓側中胚葉の一部である SHF の前駆細胞に寄与することが明らかとなった。すなわち、*Sfrp5* 発現細胞は左心室に寄与する FHF だが、*Hcn4* などの分化マーカーを発現する以前の未分化な細胞であり、また、*Sfrp5* の発現は *Isl1* の発現に先行して発現し右心室以外の SHF にも寄与する前駆細胞であることが示唆された。

最後に、*Sfrp5* 単独 KO マウスでは表現型が認められないため、*Sfrp5* の属するサブファミリー遺伝子群の *Sfrp-1,-2,-5* 全てを欠失したトリプルノックアウト (TKO) マウスを作製し、*Sfrp5* 遺伝子の心臓発生における役割について解析した。E 9.5 日目の TKO マウスでは、心臓が直線的な心筒からルーピングに至らず、心筒の流入路側に顕著に拡大することが認められた。正常マウスでは *Sfrp5* が発現する領域で β -catenin および細胞分裂の指標である Ki67 の発現が抑制されていたが、TKO マウスでは β -catenin と Ki67 陽性細胞数が正常マウスに対して多く認められた。これらの結果から、*Sfrp5* が Wnt/ β -catenin 系を抑制することによって心臓前駆細胞の分裂が制御されていることが明らかになった。これまで Wnt シグナルによる心筋細胞の分化への影響についても多数報告があるが、本解析では細胞分裂を調節する機能のみが観察され、分化に関する機能は確認されなかった。

本研究では、*Sfrp5* の発現領域が右心室以外の心筋細胞に分化する共通の心臓前駆細胞であり、心室・心房の心筋細胞への分化する際に *Sfrp5* の発現が抑制されるが、静脈洞を構成する特殊心筋細胞に分化する際にはその発現が維持されることが示された。また、*Sfrp5* は Wnt/ β -catenin シグナルを抑制することによって心臓前駆細胞の細胞分裂を制御していることが明らかとなった。本研究によって得られた知見は、iPS 細胞などから心臓前駆細胞の選択マーカーとしての利用、心臓前駆細胞の分化を抑制したまま増殖させる心臓前駆細胞培養技術、さらに心臓前駆細胞の増殖を抑制して各心筋へと特異的に分化させるなどの心筋分化誘導技術の開発など、再生医療の実現にむけての活用が期待される。