

研究報告書

「心臓細胞未分化性とクロマチン結合因子群」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 竹内 純

1. 研究のねらい

心不全が主たる原因による死亡率は成人第2位を誇り、その罹患率はガン患者のそれをも凌ぐと報告されている。よって、心不全原因究明及び機能改善を目指した再生研究は重要な課題とされている。いままで、心臓の主たる構成細胞である心筋は増殖活性が無く再生不可能とされてきたが、年間 1%程度の心筋が新たにリニューアルしていることが報告され、このリニューアルに関わる未分化細胞(心臓幹・前駆細胞)の存在が重要視され始めた。さらに心臓前駆細胞は心臓を構成する心筋以外には分化し難い特徴を持つことから、臨床応用を見越した循環器研究には ES/iPS 細胞から分化させるよりも有効的であると期待される。

本研究は、心臓幹・前駆細胞分化を制御する因子を同定し、直接心臓前駆細胞及び心筋誘導法の開発を目指す。また、心臓幹・前駆細胞制御因子を用いて、どのようなメカニズムで心臓前駆細胞が未分化状態を維持し、どのようなときに分化状態へと転ずるのか、体発生過程と心臓再生過程の両方の視点から明らかにすることを目標としている。

2. 研究成果

(1) 概要

心臓幹・前駆細胞の表面抗原マーカーは種々報告されているが、これらの細胞がどのように派生し未分化性を維持しているのかについて詳細な報告はない。本研究の理念は、心臓幹・前駆細胞共通の制御因子を探索し、ES 細胞と組織前駆細胞との相違を理解することである。

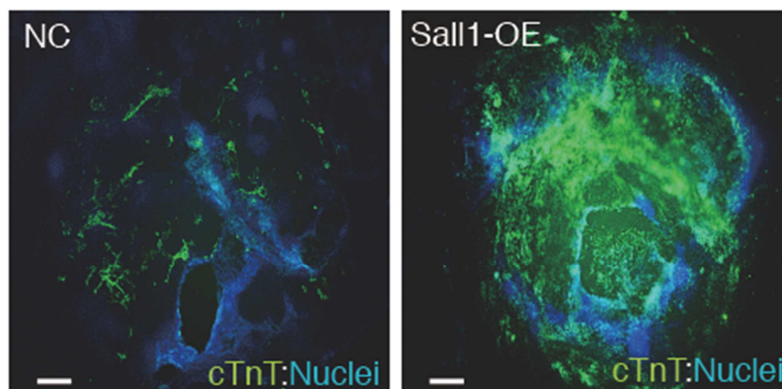
我々の先行研究により、心臓前駆細胞特異的に発現する遺伝子プロファイルから、クロマチンと結合する因子が5つ単離されてきた。本研究過程において、その中の一つである転写因子 Spalt-like 1 (Sall1) は新規の心臓前駆細胞であることが示され、Sall1 陽性の中胚葉性細胞は効率良く心筋に分化することが明らかにされた。Sall1 由来の細胞は既知の心臓前駆細胞因子 Islet1 や Mesp1 よりも広範囲の心臓を構成する細胞分化に関わっていることも細胞系譜解析により確認された。さらに、Sall1+ α 因子の強制発現系においては ES 細胞から心筋誘導を引き起こすだけでなく、Sall1+ α 因子の機能を阻害すると心臓運命を持つ細胞が消失することも明らかとなった。Sall1 は ES 細胞の未分化性維持や腎臓形成においても重要な因子であることから、特異的パートナー因子との協調的な作用により標的遺伝子群のクロマチン構造-ヒストン修飾変換を引き起しながら心臓運命決定がされることと、心臓構成細胞となる可能性を持った細胞群は既知の運命図よりも早期に決定されていると推測される。

また、後半研究において心臓再生においても Sall1 が早期マーカーとなることを見出した。

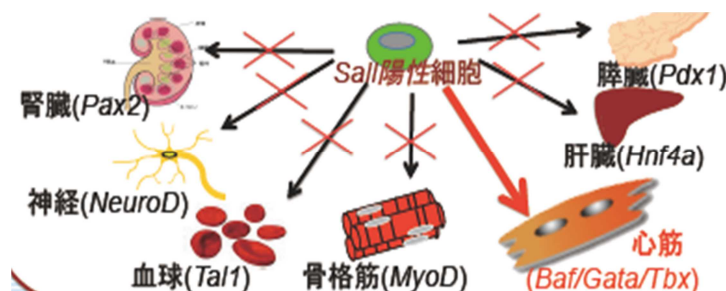
(2) 詳細

・研究テーマ A:「新規心臓誘導因子の単離・同定」

候補因子の中で Sall1 に焦点を当てて研究を行ってきた。Sall1 遺伝子座に GFP をノックインされた Sall1-GFP^{tg} マウスを用いて胎性 8.5 日胚マウス胎児から GFP 陽性細胞を選別し、この陽性細胞の性質理解を試みた。GFP 陽性細胞では cKit、Sca1、PDGFR α 等の既知の心臓前駆細胞特異的な表面抗原の発現及び Islet1/Tbx18/Nkx2-5 等の転写因子の発現が確認され、心臓転写因子である Tbx5/Tbx20 及び心筋マーカーである心トロポニンや心ミオシン等の発現は確認できなかった。興味深いことに、この GFP 陽性細胞塊を培地で培養すると、細胞全体がトロポニン陽性から細胞塊が誘導された。さらに、パッチクランプを用いた電気生理学的解析およびカルシウムイメージング解析により分化誘導された心筋は機能心筋であることが明らかとなった。Sall1-GFP^{tg} ES 細胞の分化誘導系を用いて同様な実験を行なったところ、GFP 陽性細胞は未分化性を保っているが、誘導培地で培養すると効率良く心筋細胞が分化してくることが確認された。さらにレンチウイルスの系を用いて Sall1 の強制発現を行ったところ、通常分化(NC)に比べて、効率良く心筋誘導を引き起こしていることが示された(下記挿絵参照:緑色のシグナルは cTnT 陽性細胞(心臓特異的なトロポニン T;心臓収縮因子で機能性心拍動に重要な構成タンパク質である)。以上のことから、Sall1 は新規の心臓前駆細胞のマーカーであることが示された。



次に、実際に Sall1 由来の細胞が心臓を構成する細胞へと分化しているのかを確認する為に、Sall1-ERT2^{cre} マウスとレポーターとなる ROSA-YFP マウスを交配し、胎性 7.5 日から 8.5 日にかけてタモキシフェン投与し細胞系譜追跡を行なった。胎性 14.5 日胚において YFP 陽性細胞を観察すると、心室筋/心房筋/プルキンエ線維/ペースメーカー細胞/心血管内皮/血管平滑筋にラベルされていることが確認され、実際に生体で心臓構成細胞に分化していることが示された(下記挿絵参照)。



次の課題として Sall 陽性細胞に特異的に発現している遺伝子のプロファイル作製を試みた。このプロファイルから8遺伝子まで絞り込みを行ない、時系列発生解析を行なったところ、Sall1 と酷似した発現挙動をする4遺伝子が未分化細胞特異的な候補遺伝子として解析を進めた。レンチウイルスを用いたマウス胚 *ex vivo* 強制発現系において、Sall+ α で心臓誘導を引き起こすことが示された。マウス ES 細胞を用いた *in vitro* 分化誘導系においてもウイルス投与後2日後には心臓前駆細胞マーカーである Islet1/Baf60c/Nkx2-5 の発現が認められ3-4 日に細胞全体で心トロポニン陽性細胞が確認された。Sall+ α では Islet1 及び Nk2-5 のプロモーター上でのクロマチン構造変改が起っており、Sall+ α は特異的な遺伝子領域でのエピジェネティック作用を引き起こす機能を持っていることも明らかとなった。

研究テーマ B:「候補因子の遺伝子破壊マウス及び系譜追跡用レポーターマウスの作製

研究テーマ A で単離された前駆細胞候補因子が真の心臓前駆細胞をマークする因子として機能しているのであれば、心臓形成領域で発現していないが遺伝子破壊すると心臓形成に異常が生じることが必要である。よって、候補因子群各々の遺伝子破壊マウスの作製を試みた。まず候補因子の一番手として単離された Sall1/Sall4 の遺伝子破壊(KO)マウスを作製した。Sall1 も Sall4 も mRNA レベルでもタンパク質レベルでも未分化細胞が多く存在する細胞領域(SHF)にて酷似した発現パターンを示しており、分化細胞が存在する心臓形成領域では発現していない。このような遺伝子が心臓形成に寄与するのか調べる為には、遺伝子破壊マウスを作製することで証明出来る。Sall1KO マウスでは心臓に目立った異常は見受けられず、Sall4KO マウスは e7.5 程度での早期致死となった。よって、心臓で詳細な解析を行なう為に Sall1/Sall4 のダブル KO(Sall1/4DKO)マウスの作製(Sall1^{flox/flox};Sall4^{flox/flox};Msp1cre)を試みた。Sall1/4DKO マウスは e9.0 迄に胎性致死となり、Islet1/Nkx2-5 の発現減少を伴った極度な心臓低形成異常が見受けられた。よって、Sall1 と Sall4 は機能的な代償作用があり、Sall1 及び Sall4 があれば心臓前駆細胞が維持されると示唆される。ES を用いた機能阻害(ノックダウン:KD)系を用いても同様な実験を行なった。ES を分化誘導後、siRNA による Sall の KD(siSall)のみで心筋収縮因子の発現減少及び消失が見受けられた。さらに、siSall+ α 因子の KD により心筋転写因子群の消失と完全に心筋誘導が抑制された。この系では中胚葉因子の極度の発現減少も見受けられたことより、心臓細胞に分化する可能性を持った細胞群は中胚葉因子が発現する時期にコミットされていると考えられる。

次に、Sall1 を発現した細胞の系譜追跡のため creERT2 をノックインした Sall1creERT2 マウスを作製した。このマウスとレポーターマウスである ROSA-YFP または ROSA-RFP マウスと交配し、e6.5/e7.5/e8.5 でタモキシフェンを投与し細胞系譜追跡を行なった。Sall1 は未分化細胞が多く存在する第二心臓予定域(SHF)にて発現するが、この細胞群は e10.5/e14.5 のマウス心臓にて心臓構成細胞に分化していることが確認された。

研究テーマ C:「心臓再生時に出現する Sall1 陽性細胞の寄与における研究」

本研究前半テーマで見出した心臓誘導因子は心臓発生時にのみならず、心臓再生時においても再誘導が見受けられた。この因子は心筋切除に伴って誘導されてくるだけでなく、細胞系譜追跡により心筋へと分化していることが示された。興味深いことに、この陽性細胞は

心筋には発現していない。心臓再生時に心臓を構成する線維芽細胞を始め分化細胞が心臓前駆細胞因子へと巻き戻るのか、ゲノムワイドでのクロマチン・ヒストン変化領域の特定が必須であると考えられ、早急に解析を始める予定である。現在では未成熟な心筋細胞が哺乳類の心臓再生時に主たる寄与細胞群と報告されており、心筋の性質を理解し、増殖活性を保つことこそが重要とされてきた。今回の発見は、心筋以外の心臓構成細胞も心臓再生に寄与する新規の報告であり、心臓再生のみならず臓器再生において心筋以外の細胞の活性化・可塑性を理解していく必要があると考えられる。

3. 今後の展開

1)心筋誘導について

ヒト iPS 細胞を用いて心筋誘導の効率化を目指し(再生医療ネットワーク・個別課題研究 H25-27)、ヒト心筋症患者由来 iPS 細胞からの心筋誘導法及び研究に貢献することを目指す。また、心臓前駆細胞の未分化性を制御している可能性が多いにあるエピジェネティック因子を二つ同定してきた。この制御機構を明らかにし、どのように心臓前駆細胞が分化に転ずるのか、明らかにする。

2)心臓再生において

同定してきた Sall1 をマーカーとして Sall1 を誘導するサイトカインシグナルを見出す。これにより心臓再生研究の発展に寄与すると考えられる。また、Sall1 を発現する細胞の性質理解を目指すと同時に、エピジェネティックな制御機構との関係も調べる。

4. 評価

(1)自己評価

(研究者)

単離された心臓前駆細胞をマークする因子各々を解析していきながら、心臓前駆細胞の制御機構だけでなく、心臓前駆細胞の由来について新しい現象を明らかにした。スクリーニングで単離され板 GPC5 は幹細胞が非対称分裂し分化する際に重要な機能をしていると考えられる。このようなマーカー因子は心臓前駆細胞が如何に未分化を保ちつつ、分化していくのかについて調べていく上で良いキーマーカーとなり得る。ES から直接心臓誘導を引き起すことも明らかに出来、創薬研究へ発展すると考えられる。さらに、本研究で明らかにされた新しい点として、本来考えられていた運命図より以前に心臓予定マップが決定されていることを突き止めた。Sall1 を指標にすることにより、心臓前駆細胞と分化細胞とのエピジェネティック変化を特定することも可能と考えられ、今後は未分化細胞の維持メカニズムの理解へ発展研究できると考えている。本研究の後半で、新規心臓前駆細胞マーカーである Sall1 が心臓再生に寄与することを見出し、心筋以外の細胞群の可塑機構の研究理解へも発展できた。研究結果は特許・招待講演・総説において積極的に取り組んできた。本さきがけ研究員と iPS 研究について共同研究も開始出来た(文科省再生医療ネットワーク個別課題研究 H25-27)。さらに、臨床応用・創薬研究への期待もされている(厚労省科学研究費分担研究 H28-)。残された課題は、投稿中の本研究結果を国際科学論文として、一刻も早期に報告することを心がける。さらに、創薬スクリーニング研究を推進するとともに、細胞の可塑性と未分化維持機構について新たなメカニズムの理解を目指す。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

さきがけ採択以前の業績が優れており、iPS にこだわらず心臓幹細胞を極めることを期待して採択した。途中で病に倒れるというアクシデントもあったが、それでもさきがけ採用後に採択された論文がまだないのは残念だ。現在投稿中の論文が受理されることが、もっとも重要な課題だろう。

研究内容だが、最初の遺伝子探索から Sall 遺伝子を選び、これが中胚葉から心筋への発生過程の中間段階で発現することを突き止めるまでは順調だが、その後この分子を指標に心臓の発生学に入って行ったのは、竹内自身のこれまでの研究の特徴を殺したのではと思っている。ノックアウトや系譜解析より、成熟マウスの心筋幹細胞解析に使えるかどうかで割り切っていくことが重要ではないかと思う。報告書からも、成熟個体での心筋再生の視点が完全になくなっている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Takeuchi et al., (2015) <i>PLOS ONE</i> . 10(5):e0126562
2. Koshiba-Takeuchi et al., (2015) <i>Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease</i> . in press
3. Sadek et al., (2014) <i>Stem Cell Report</i> . Jul 8:3(1)
4. Van Weerd et al., (2011) <i>Cardiovas. Res</i> . 91,203-211.
5. Takeuchi et al., (2011) <i>Nat. Commun</i> . 2:187,1-11

(2) 特許出願

研究期間累積件数:3件

1.

発明の名称 成熟した心筋細胞を分化誘導させる方法
発明者 竹内純、森田唯加
出願日 2015.9.24
出願人 国立大学法人 東京大学
出願番号 特願2015-187363

2.

発明者: 竹内純、森田唯加、塚原由布子
発明の名称: 特定因子による心臓幹・前駆細胞の誘導/活性化方法
出願人: 東京大学
出願日: 2013/1/22
出願番号: 東京大学知財部管理番号: 32B121002-1



国際出願番号：PCT/2012/011458（国際特許へ移行）

3.

発明者：竹内純、森田唯加、塚原由布子

発明の名称：高効率心臓細胞分化能を持った新規心臓前駆（幹）細胞制御因子の樹立法

出願人：東京大学

出願日：2012/1/23

出願番号：特願 2012-011458

東京大学知財部管理番号：32B121002-1 整理番号：12-0021-001JP01

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(招待講演)

1. America Heart Association Asia Session (Tokyo) session chair 2014
2. Berlin Cardiovascular Development Meeting 2013 in Europe Society of Cardiology (Berlin) keynote lecture and session chair 2013
3. Takeuchi JK., Berlin Cardiovascular Development Meeting 2013 in Europe Society of Cardiology (Germany) 9月28日(2013)
4. 竹内純「Cardiomyocyte Survival and Regeneration~How can we get anti-aging hearts?~」Merck Millipore BioScience Forum 2013(東京)9月10日(2013)
5. Takeuchi JK., Heart cells survival by the defined factors. The 7th TAKAO International Symposium 2013 (Tokyo) (2013)
6. Takeuchi JK., Epigenetic Factors in Cardiac Development and Regeneration. 第7回日仏先端科学(JFFoS)シンポジウム(滋賀)1月25日(2013)
7. Takeuchi JK., Rate-limiting Function of Chromatin/Histone Modulation for Cardiac Specification. The 28th Annual Meeting of the International Society for Heart Research (ISHR) (Tokyo) 12月3日(2011)

(国内学会)

1. 竹内純「心臓再生能力を司るクロマチン結合因子群」第33回日本炎症・再生医学会(福岡)7月5日(2012)
2. 竹内純「マウスが紐解く心臓研究のアプローチ」日本遺伝学会第83回大会(京都)9月3日(2011)
3. Takeuchi KJ.「Chromatin Regulates Cardiac Cell Fates and Keep a Healthy Heart」第33回日本分子生物学会シンポジウム(神戸)12月7日(2010)

(受賞)

1. ゴットフリート・ワグネル賞 2010 ドイツノベーションアワード(平成24年5月)
2. 公益財団法人万有生命科学振興国際交流財団 Banyu Foundation Research Grant 2012 第1回万有医学奨励賞 優秀賞(平成24年12月8日)



(著作物)

1. ○辻真人、竹内純「心臓発生・疾患とエピジェネティック因子」細胞工学（秀潤社） Vol. 33, No. 11, 1143-1151, 2014 堀優太郎、森下環、中村遼、小柴和子、竹内純「エピジェネティック因子と心臓発生・心疾患」イラストで徹底理解する エピジェネティクス キーワード事典 実験医学（2013）
2. 竹内純（企画・編集）実験医学 Vol. 30 No. 18, 2896-2901, 2012（羊土社）特集「受精卵から多様な組織を造り出す 発生のエピジェネティクス」「エピジェネティクスで組織可塑性を理解する」
3. 中村遼、塚原由布子、竹内純 実験医学 Vol. 30 No. 18, 2923-2931, 2012（羊土社）特集「受精卵から多様な組織を造り出す 発生のエピジェネティクス」「心臓発生と心疾患のエピジェネティクス ークロマチンモデリング因子・ヒストン修飾因子が織りなす複雑な臓器発生機構のモデルとしてー」

(プレスリリース等)

1. 「特定遺伝子による心室筋を開発！」（日本経済新聞社朝刊「科学面」 2015年8月3日）
2. 「今さら聞けないプラス：いきている化石」朝日新聞朝刊 6月18日(2011)