

令和 3 年 10 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08443

研究課題名(和文) 特殊心筋の発生分化制御機構

研究課題名(英文) Analysis of regulating mechanism for development and differentiation of special cardiomyocytes

研究代表者

小久保 博樹 (Hiroki, Kokubo)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・講師

研究者番号：10270480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：心筋の分化の過程、すなわち未分化性の心臓前駆細胞がいかにして心房と心室を構成する固有心筋と拍動を制御する洞房結節を構成する特殊心筋へと分化するのか、その分子機構を理解することは再生医療技術の発展において重要な鍵となる。本研究では、これまでに新規に同定した、将来流出路、左心室、心房、静脈洞を構成するための心臓前駆細胞に着目して、未分化性を維持する、もしくは二つの性質の異なる心筋へと分化するために必要な転写因子やシグナル分子を明らかにすることで、心筋分化の分子機構を解明することを目的として、特に心筋への分化の制御におけるBMPシグナルの役割を中心に検討し、新たな心筋分化制御機構が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

循環器領域は、iPS細胞より誘導分化させた固有心筋の細胞シートを心不全患者に直接移植する治療法が治験に入るなど、再生医療が実用段階に入っている。しかしながら、心筋前駆細胞が如何にして固有並びに特殊心筋へと分化するのか、その分子メカニズムは分かっていない。本研究によって、Bmpの心筋制御の新たな分子機構を明らかにできたことは、大きな学術的意義を持つと考えられる。この知見を基に、iPSやES細胞から固有心筋や特殊心筋を効率的に分化誘導する方法へと結び着くことが期待され、大きな社会的意義を持つと考えている。

研究成果の概要(英文)：Understanding of the molecular mechanism of cardiomyocytes differentiation, how the heart progenitor cells differentiate into the working myocardium consisting atria and ventricles, and also into special myocardium constituting sinus venous, including the sinoatrial node controlling heartbeat, has an important key role in the development of the regenerative medicine technology. In this study, we have examined how this progenitor cells are regulated to differentiate into two working and special myocardium, mainly on the role of the BMP signal, in order to elucidate molecular mechanism of the myocardium differentiation by focusing our newly identified heart progenitor cell population to contribute to the left ventricle, the atria, and the sinus venous, and clarified a new mechanism for myocardium differentiation.

研究分野：発生生物学

キーワード：心筋

1. 研究開始当初の背景

心臓は、原腸陥入によって出現した中胚葉が胚体の前方に移動して馬蹄形の心臓原基が形成され、その心臓原基が頭部形成と共に前方へと伸張して心筒を形成し、さらに伸展して心房を含む流入路が頭部側へと移動するようにルーピングし、最終的に心房と心室が中隔と弁によって隔てられた2心房2心室を持つ形態へと成熟すると考えられてきた。しかしながら、最近、心筋特異的遺伝子の発現が認められる従来の心臓原基（一次心臓領域）の腹側側に、臓側中胚葉となる領域（二次心臓領域）が存在し、この臓側中胚葉の一部が流出路と右心室、並びに心房の一部に寄与することが示され、臓側中胚葉に肺循環を形成する心臓の前駆細胞が存在することが明らかとなってきた。我々は、心筋細胞の分化には Wnt シグナルなどの液性因子による緻密な遺伝子発現制御が必要とされるとの報告があることから、Wnt リガンドの競合阻害を行う分泌型の受容体の一つである *Secreted frizzled related protein (Sfrp) 5* 遺伝子に着目し、心臓形成時期に於ける発現や *Sfrp5-Cre* および *Sfrp5-ERT2Cre* マウスを用いた細胞系譜を追った実験から、*Sfrp5* を発現する細胞群が、後に一次心臓領域に由来するとされる左心室領域や二次心臓領域に由来するとされる流出路と心房の一部に、さらに一次や二次心臓領域とは別の前駆細胞が想定されていた静脈洞へと寄与することを示し、右心室以外の心筋へと分化する新たな心筋前駆細胞を同定し、新たな心臓形成モデルを提唱するに至った (Fujii et al. *Nat Commun.* 2017)。

心筋前駆細胞の分化過程に於けるWntシグナルの機能を解析するため、*Sfrp5* が属する全ての遺伝子を欠損させ、Wntシグナルが過剰になる *Sfrp1*、-2、-5 重複欠損 (TKO) マウスを作製して解析したところ、TKO マウス胚では、流入路の未分化細胞群が過形成となる一方で心臓の低形成が認められたこと、培養した未分化細胞群に Wnt 阻害因子を加えても分化が阻害されなかったことなどから、Wnt シグナルは心筋細胞へと分化というよりむしろ、分化した後の増殖を促進する働きがあることが示され、心筋の分化を制御するシグナルを見出すには至らなかった。

これまで、心筋分化において *Smad4* 遺伝子を欠損させることによって Bmp/TGF- β シグナルの機能を検証する試みは、いくつか既に報告されている。*Smad4* を全ての細胞で欠損させた場合、中胚葉が形成されずに胎生致死となり、3胚葉の形成分化し重要な役割を果たすことが示されたが、心筋の分化については解析できなかった。そこで、分化した心筋で特異的に欠損させる試みがなされ、 α -Mhc-Cre マウスとの掛け合わせによって心筋分化の後期で *Smad4* 遺伝子を欠損させる様にした場合では、心筋の hypertrophy が認められ、心筋の恒常性の維持に機能を果たすことが示された。また、 α -SMA-Cre マウスと掛け合わせて心筋の分化段階の早期に欠損させた場合でも、心臓の低形成が認められながらも胎生致死とならず生存可能となり、心筋の増殖に機能するという見解が示されたが、いずれにせよ心筋分化した後に *Smad4* 遺伝子を欠損させて解析したために、心筋分化過程に重要な働きがあることが示されなかった。我々は、心筋へと分化する未分化な細胞で *Smad4* 遺伝子を欠損させることによって、Bmp/TGF- β シグナルの心筋分化への役割が明らかになると考え、研究を進めることとした。

2. 研究の目的

心筋の分化の過程、すなわち未分化性の心臓前駆細胞がいかにして心房と心室を構成する固有心筋と静脈洞の一部で拍動を制御する洞房結節を構成する特殊心筋へと分化するのか、その分子機構を理解することは再生医療技術の発展において重要な鍵となる。本研究では、これまでに新規に同定した、将来流出路、左心室、心房、静脈洞を構成するための心臓前駆細胞に着目して、未分化性を維持する、もしくは二つの性質の異なる心筋へと分化するために必要な転写因子やシグナル分子を明らかにすることで、心筋分化の分子機構を解明する。さらに、得られた知見から、

今まで確立されていない ES や iPS 細胞を特殊心筋へと分化誘導する技術の確立を目指し、医療技術の発展につながる心筋組織再生という分子基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、Bmp/TGF- β シグナルに焦点を当てて、解析することとした。Sfrp5-Cre マウスに Smad4-floxed マウスを掛け合わせて、心筋前駆細胞特異的に Smad4 遺伝子を欠損される条件的欠損マウスcKOマウスを作製し、得られた各時期（胎生7.5日～10.5日）の胎仔の外見や、切片を作製して後に内部構造を観察し、心臓前駆細胞において Bmp/TGF- β シグナルが欠落した場合に心筋に分化できるのか否かなど、その表現型を明らかにし、Bmp/TGF- β シグナルの心臓の各構成因子の分化への機能を明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

Smad4-cKOマウスの胎仔は、胎生6.5日までに致死となるnullマウスより発生が進み、心臓原基から心筒が形成される胎生8.5日付近で致死となり、心臓が著しく低形成となることを観察した（図1）。マウス胚から心臓を摘出し、様々な一次心臓領域や心筋分化マーカーの発現量をRT-PCR法によって検討した。その結果、一次心臓領域に特異的な転写因子や心筋特異的マーカーの発現低下が認められた。

Smad4-cKO マウスの表現型が Nkx2.5-KO マウスの表現型と非常に酷似していることや、Nkx2.5 が Bmp によって直接制御されている可能性を示唆する論文が発表されていることから、Nkx2.5 の発現解析を行ったところ、Nkx2.5 の発現量は低下しているものの、*in situ* ハイブリダイゼーションで確認されたことから、Nkx2.5 が直接 Bmp シグナルの制御を受けていない可能性が示唆された（図2）。

そこで我々は、Nkx2.5 の核内移行が Bmp/TGF- β シグナルによって制御されている可能性を考え、免疫組織化学的な解析を行ったところ、Smad4-cKOマウス胚では正常胚と比較して、核内移行している Nkx2.5 が著しく減少していることを見出した（図3）。

Nkx2.5 の核内への移行は、ユビキタスに発現する Casein kinase (CK) II の作用によって、Nkx2.5の核内移行シグナル付近のセリン残基がリン酸化されることで促進され、脱リン酸化酵素 Protein phosphatase1 (PPP1) によって核外移行が促進される。PPP1 の核内移行は、そのサブユニットである Mypt1 によって制御され、活性は Regulatory subunit (PPPR) C3 を含む阻害サブユニットによって制御されることが知られる。そこで、CK II の発現を定量したところ、発現量は正常胚の約半分程度まで低下しているものの、*in situ* ハイブリダイゼーションで確認されたことから、CK II の発現を Bmp/TGF- β シグナルが直接の制御しない可能性が示唆された。また、リ

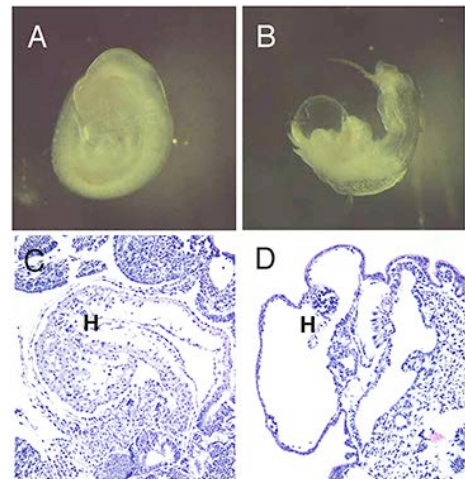


図 1 cKO マウス胚の心臓は低形成となる。胎生 9.5 日目胚の外観 (A, B) と切片像 (C, D)。正常胚 (A, C)、cKO マウス胚 (B, D)。

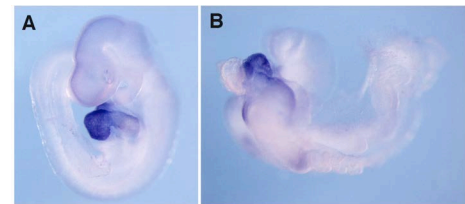


図 2 Nkx2.5 は cKO マウス胚でも発現する。正常胚 (A)、cKO マウス胚 (B)。(胎生 9.5 日目)。

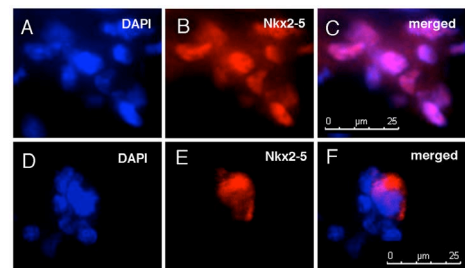


図 3 Nkx2.5 の核内移行は cKO マウス胚ではほとんど見られない。正常胚 (A-C) では、核のマーカーである DAPI (A) のシグナルと Nkx2.5 (B) のシグナルが重なる (C) のに対し、cKO マウス胚 (D-F) では、DAPI (D) と Nkx2.5 (E) のシグナルが重ならない (F)。(胎生 9.5 日目)。

ン酸化酵素と脱リン酸化酵素の各サブユニットの発現が Bmp/TGF- β シグナルによって制御される可能性について調べた。心筋細胞で発現が確認されている脱リン酸化酵素の活性化抑制サブユニットの発現量は著しく低下するが、*in situ* ハイブリダイゼーションで確認されたことから、Bmp/TGF- β シグナルの直接制御を受けていない可能性が示唆された。

現在、Smad4 が Nkx2.5 と直接相互作用することによって核内移行を制御する可能性について検討を重ねている。本研究をさらに進めることで、新たな心筋分化制御機構につながるかと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Noguchi YT, Nakamura M, Hino N, Nogami J, Tsuji S, Sato T, Zhang L, Tsujikawa K, Tanaka T, Izawa K, Okada Y, Doi T, Kokubo H, Harada A, Uezumi A, Gessler M, Ohkawa Y, Fukada SI. Cell-autonomous and redundant roles of Hey1 and HeyL in muscle stem cells: HeyL requires Hes1 to bind diverse DNA sites. *Development*. 146(4), dev163618, 2019 査読有り
2. Nakatsu Y., Kokubo H., Bumdelger B., Yoshizumi M., Yamamotoya T., Matsunaga Y., Ueda K., Inoue Y., Inoue MK., Fujishiro M., Kushiya A., Ono H., Sakoda H., and Asano T. The SGLT2 Inhibitor Luseogliflozin Rapidly Normalizes Aortic mRNA Levels of Inflammation-Related but Not Lipid-Metabolism-Related Genes and Suppresses Atherosclerosis in Diabetic ApoE KO Mice. *Int J Mol Sci*, 18(8) 1704, 2017 査読有り
3. *Fujii M., Sakaguchi A., Kamata R., Nagao M., Kikuchi Y., Evans SM., Yoshizumi M., Shimono A., *Saga Y., and *Kokubo H. *Sfrp5* identifies murine cardiac progenitors for all myocardial structures except for the right ventricle. *Nat Commun*. 8:14664, 2017 *co-corresponding authors 査読有り
4. *Kamata R., Bumdelger B., Kokubo H., Fujii M., Yoshimura K., Ishida T., Ishida M., and Yoshizumi M. EPA Prevents the Development of Abdominal Aortic Aneurysms through Gpr-120/Ffar-4. *PLoS One*. 11(10): e0165132, 2016 査読有り
5. Funato N., Kokubo H., and Saga Y. Transcriptomic analyses of Hand2 transgenic embryos. *Genom Data*. 9: 60-2, 2016 査読有り
6. Funato N., Kokubo H., Nakamura M., Yanagisawa H., and Saga Y. Specification of jaw identity by the Hand2 transcription factor. *Sci Rep*. 6: 28405, 2016 査読有り
7. Kato Y., Katsuki T., Kokubo H., Masuda A., and Saga Y. Dazl is a target RNA suppressed by mammalian NANOS2 in sexually differentiating male germ cells. *Nat Commun*. 7:11272, 2016 査読有り

[学会発表] (計 18 件)

1. 坂口あかね、小久保博樹、安島理恵子、相賀裕美子 “心臓における刺激伝導系前駆細胞の系譜解析” 第 124 回日本解剖学会総会 シンポジウム “血管研究のイノベーション：構成細胞の起源と形成メカニズムを考える” (新潟 2019 年 3 月)
2. 小久保博樹、吉栖 正生 “心臓前駆細胞から見た心臓形成 — 冠状動静脈から刺激伝導系まで” 第 59 回日本脈管学会総会 シンポジウム「発生学から見た心肺・血管・リンパ管学」(広島 2018 年 10 月)
3. 唐崎航平、Batmunkh Bumdelger、小久保博樹、吉栖正生“EPA は JNK シグナル伝達経路の制御を通して腹部大動脈瘤の増悪を抑制する” 第 59 回日本脈管学会総会 (広島 2018 年 10 月)

4. 坂口あかね、小久保博樹、相賀裕美子 心臓における刺激伝導系前駆細胞の系譜解析 第73回日本解剖学会中国・四国支部学術集会(徳島 2018年10月)
5. Hiroki Kokubo, Masayuki Fujii, and Masao Yoshizumi “Fate mapping of two types of cardiac progenitor cells” Weinstein Cardiovascular development and regeneration conference (Nara Japan 2018年5月)
6. 小久保博樹 “心臓前駆細胞から見えてくる心臓発生” 慶応大学循環器講座セミナー(東京 2018年3月)
7. 小久保博樹 “右心室以外に寄与する新たな心臓前駆細胞の同定” 心血管代謝週間 CVMW2017 合同シンポジウム2「心血管系の発生分化と再生研究の新たなアプローチ」(大阪 2017年12月)
8. Hiroki Kokubo, Masayuki Fujii, Akane Sakaguchi, Masao Yoshizumi, Yumiko Saga “Identification of cardiac progenitors for the outflow tract, the left ventricle, the atria, and the sinus venosus” 第40回日本分子生物学会総会 シンポジウム「心筋再生の礎を築く新しい心臓発生学」(横浜 2017年12月)
9. 小久保博樹, 藤井雅行, 坂口あかね, 相賀裕美子, 吉栖正生 “右心室以外の心筋へと寄与する新たな心臓前駆細胞の同定”第72回日本解剖学会中国・四国支部学術集会(広島 2017年10月)
10. Hiroki Kokubo, Masayuki Fujii, Akane Sakaguchi, Yumiko Saga, Masao Yoshizumi “Novel cardiac progenitors for all components of the heart except for the right ventricle” The 8th TAKAO International Symposium 2017(松江 2017年10月)
11. 藤井雅行, 坂口あかね, 吉栖正生, 相賀裕美子, 小久保博樹 “右心室以外の心筋へと寄与する新たな心筋前駆細胞の同定” 第53回日本小児循環器学会総会・学術集会(浜松 2017年7月)
12. Batmunkh Bumdelger, Hiroki Kokubo, and Masao Yoshizumi Osteoprotegerin prevents from aortic aneurysm development. 第49回日本動脈硬化学会総会・学術集会(広島 2017年7月)
13. 坂口あかね, 吉栖正生, 相賀裕美子, 小久保博樹 “Identification of early progenitors for the cardiac conduction system in murine heart development” 第50回日本発生生物学会総会・学術集会(東京 2017年5月)
14. Masayuki Fujii, Akane Sakaguchi, Sylvia M. Evans, Masao Yoshizumi, Yumiko Saga, and Hiroki Kokubo “*Sfrp5* identifies cardiac progenitor cells for the outflow tract, the left ventricle, the atria, and the sinus venosus, but not for the right ventricle” Weinstein Cardiovascular development and regeneration conference (Columbus OH USA, 2017 May)
15. Masayuki Fujii, Akane Sakaguchi, Masao Yoshizumi, Yumiko Saga, and Hiroki Kokubo “Identification of cardiac progenitors for all myocardial structures except for the right ventricle.” 第122回解剖学会(長崎 2017年3月)
16. Ryo Kamata, Hiroki Kokubo, Batmunkh Bumdelger, and Masao Yoshizumi “EPA attenuates the progression of Abdominal Aortic Aneurysms” 第81回日本循環器学会学術集会(金沢 2017年3月)
17. Masayuki Fujii, Akane Sakaguchi, Masao Yoshizumi, Yumiko Saga, and Hiroki Kokubo “Identification of cardiac progenitors for the outflow tract, the left ventricle, atria, and the sinus venosus.” 第81回日本循環器学会学術集会(金沢 2017年3月)
18. 鎌田諒, 小久保博樹, Batmunkh Bumdelger, 吉栖正生 “腹部大動脈瘤に於けるEPAの抑制機構” 第57回日本脈管学会総会(奈良 2016年10月)

[図書] (計 3件)

1. 小久保博樹 “右心室以外の心臓を構成する心筋へと寄与する新たな前駆細胞の同定” 広島大学大学医学部医学科同窓会誌 広仁会会報 第94号 学術記事p34-35 2018年
2. 小久保博樹, 藤井雅行, 吉栖正生 心臓前駆細胞から見えてくる心臓の成り立ち 生体の科学 68(6) pp.514-519 2017
3. 小久保博樹 “右心室以外の心臓を構成する細胞へ分化する前駆細胞を発見” 広島大学大学院歯薬保健学専攻科広報誌 BHSニュース 第12号 優れた論文p7 2017年

[産業財産権]

○出願状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

- ・右心室以外の心臓を構成する細胞へ分化する前駆細胞を発見
https://www.hiroshima-u.ac.jp/system/files/89898/BHS_NEWS_Vol12_7.pdf
- ・Precursor cells for all components of the heart
<https://www.hiroshima-u.ac.jp/en/news/43350>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：吉栖 正生
ローマ字氏名：Yoshizumi Masao
所属研究機関名：広島大学
部局名：医歯薬保健学研究科（医）
職名：教授
研究者番号（8桁）：20282626

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：相賀 裕美子
ローマ字氏名：Saga Yumiko

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。