

# 論文の内容の要旨

論文題目

## Cardiac cell fate determination and regeneration by the transcription factor *Sall1*

(心臓細胞運命決定および心臓再生に関わる転写因子 *Sall1* の研究)

氏名 森田 唯加

### <序論>

心臓を構成する細胞は主に中胚葉性細胞に由来し、心臓前駆細胞の段階を経て大きさ・かたち・機能の異なる心臓構成細胞へと分化する。中胚葉因子の中でも *Mesp1* は、心臓細胞への運命決定に関わる因子としてこれまで認知されてきたが、*Mesp1* 陽性細胞は心臓細胞に限らず、血球系の系譜や骨格筋へと分化してこることも知られており、未だに如何にして心臓細胞への分化運命が決定づけられるのか明らかにされていない。

本研究では、心臓細胞への運命決定メカニズムを明らかにすることを目標に、まずはヘテロな心臓前駆細胞集団に共通に発現する因子のスクリーニングを行った。その結果、ジンクフィンガー型転写因子 *Spalt like1 (Sall1)* に着目した。

*Sall1* は神経前駆細胞および腎臓前駆細胞の維持に寄与することが知られている。また心臓に関しては、心室中隔欠損を伴う Townes Brocks Syndrome の責任遺伝子として報告されており、正常な心臓発生に必須な因子と考えられる。しかしながら、初期心臓発生過程における *Sall1* の機能に関してはこれまで全く明らかにされていなかった。本研究では、初期心臓発生における *Sall1* による心臓細胞運命決定への関与、および *Sall1* と協調的に心臓発生に寄与するパートナーの解析を行った。

また、これまでほ乳類の心臓再生は不可能と考えられてきたが、近年出生後 1 週間以内のマウスは心臓再生可能であることが報告された。その再生現象を引き起こす要因として、心筋の脱分化による増殖の活性化を伴う幼若心筋化、お

よび内在に存在していた静止状態の心臓前駆細胞の活性化がこれまでに報告された。本研究で見いだされた転写因子 *Sall1* が、心臓再生過程においても心臓前駆細胞の活性化や分化に寄与しているのか解析を行った。

<結果>

### 1. *Sall1* は新規の心臓前駆細胞因子であり、心筋細胞への分化を促進する

初期発生過程において心臓は大きく 2 つの領域、分化した心臓細胞で構成される第一心臓予定領域(First Heart Field; FHF)と FHF に隣接し発生後期まで心臓前駆細胞が第二心臓予定領域(Second Heart Field; SHF)で構成される。マウス胚 E7.5 では、*Sall1* は FHF には発現せず、SHF に発現する特異な発現パターンを呈しており (Figure 1)、発生後期においても *Sall1* は FHF に発現せず、E10.5 以降は徐々に消失していった。そこで、tamoxifen 依存的に *Sall1* の細胞系譜追跡が可能な *Sall1*<sup>CreERT2/+</sup>マウスと *ROSA26*<sup>YFP/+</sup>レポーターマウスを交配し、実際に心臓形成に寄与しているのか解析を行った。その結果、E7.0 および 8.0 に tamoxifen を投与し E10.5 に解析を行うと、YFP 陽性細胞が心臓内の全域に観察され (Figure 2)、かつ主要な心臓細胞(心房筋・心室筋・心内皮・心外膜・ペースメーカー細胞)に分化していることが明らかとなった。これらの結果から、*Sall1* は新規の心臓前駆細胞因子であることが示された。

次に *Sall1* が心臓前駆細胞に発現する意義を明らかにするため、*Sall1*<sup>GFP/+</sup> ES 細胞を用いて *Sall1* 陽性/陰性細胞の心筋分化効率の比較を行った。ハンギングドロップ法を用いて 2 日間培養した後、セルソーターにより GFP<sup>+/+</sup>に選別後、遺伝子発現解析および再び心筋誘導を行った。定量的な遺伝子発現解析の結果、興味深いことに GFP<sup>+</sup>細胞では GFP<sup>-</sup>細胞に比して、心臓前駆細胞因子群の発現が顕著に高く、分化初期段階において既に *Sall1* が心筋細胞への分化を特異化させている可能性が示唆された。さらに心筋誘導後の解析では GFP<sup>+</sup>細胞からは心トロポニン陽性細胞が多く観察され、心拍動する EB も多く得られた。定量的な遺伝子発現解析では GFP<sup>+</sup>細胞では心筋構成因子の発現が高く、また興味深いことに他臓器マーカーの発現は抑制されていることが明らかとなった。

次に *Sall1* が積極的に心筋誘導を引き起こしているのか明らかにするため、マウス ES 細胞に対して *Sall1* レンチウイルスを投与し強制発現を行った結果、*Sall1* は心筋誘導を引き起こすことが示され、また siRNA を用いた発現阻害を行うと心筋誘導が抑制されることを見出した。そこで、マウスにおける *Sall1*

の心筋誘導能がヒトにおいても保存された機能であることを理解するために、Doxycyclin (DOX) 依存的に *Sall1* を誘導することが可能なヒト TG iPS 細胞を用いて検討を行った。中胚葉誘導および心臓前駆細胞誘導段階において DOX 依存的に *Sall1* を誘導し、誘導 10 日目に FACS によりトロポニン I 陽性細胞数を定量化した結果、DOX 無添加に比して 2 倍以上誘導されていることを明らかにした。また、心臓前駆細胞段階以降で DOX を添加すると心筋誘導が抑制されることから、*Sall1* による心筋誘導はタイミングが重要であると考えられる。

## 2. *Sall1* と *Mesp1* は協調的に心臓を形成する

*Sall1* と相乗的に心臓形成に寄与するパートナーの探索を行ったところ、E6.5 において *Sall1* と *Mesp1* は非常に類似した発現パターンを呈していたため、*Mesp1* に着目した。*Sall1* 発現細胞と *Mesp1* 由来細胞が同様の心臓細胞系譜に乗るのか、*Sall1*<sup>GFP/+</sup>;*Mesp1*<sup>Cre/+</sup>;*ROSA26*<sup>RFP/+</sup>マウスを作製し、E6.5,7.5,8.0 胚を用いてそれぞれ FACS ソートを行った。興味深いことに、各ステージにおいて、*Mesp1* の系譜に依存しない *Sall1* 陽性細胞 (GFP+RFP-細胞) が存在しており、それらの分画を培養すると、心トロポニン陽性細胞へと分化することを見出した。この結果から、*Sall1* 陽性細胞のうち一部は *Mesp1* とは異なる心臓細胞系譜を辿ることが示唆された。そこで、*Sall1* と *Mesp1* が協調的に心臓形成に寄与しうるのか *Sall1*<sup>GFP/+</sup>マウスおよび *Mesp1*<sup>Cre/+</sup>マウスを用いて遺伝子欠損マウスを作製した。*Sall1* ヘテロ *Mesp1* ヘテロマウスでは通常的心臓発生を示し、*Sall1* ヘテロ *Mesp1* ホモマウスでは、二叉心臓を示した。驚くべきことに、*Sall1* ホモ *Mesp1* ホモマウスでは、心臓領域が見受けられなかった (Figure 3)。ヒトにおいても *Sall1* と *Mesp1* は協調的に心筋誘導を引き起こすか、DOX 依存的な *Sall1*-*Mesp1* ヒト iPS 細胞を用いて検討を行った結果、*Sall1* あるいは *Mesp1* 単独で強制発現させた条件よりも *Sall1*-*Mesp1* の組み合わせで非常に効率よく心筋誘導が引き起こされることを見出した。以上の結果から、初期発生において *Sall1* は *Mesp1* と協調的に心臓形成に寄与し、また、マウス/ヒトにおいて保存された機能を有していることが示唆された。

## 3. 心臓再生時に *Sall1* が再誘導され、*Sall1* 陽性細胞は心筋細胞へと分化する

心臓発生段階において心臓前駆細胞に発現する *Sall1* が心筋分化を促すように、心臓再生時においても *Sall1* が心臓前駆細胞の活性化および心筋分化を引き

起こすのではと考え、出生後2日目の *Sall1*<sup>GFP/+</sup>マウスの心尖部を切除し2日後に観察した結果、切除部位を縁取るようにGFPの発現が見受けられ (Figure 4)、14日後には消失するという興味深い、一過的な発現を示した。そこで、再誘導された *Sall1*+細胞の由来を調べるために、様々な細胞マーカーを用いてFACSを行った結果、大変興味深いことに *Sall1*+細胞の80%以上が心臓線維芽細胞マーカーの1つである *Thy1* 陽性であることが明らかとなった。さらに、*Sall1* 陽性細胞がどのような細胞種に分化するのか、細胞系譜追跡を行った結果、サルコメア構造を有する心筋細胞へと分化することを見出した (Figure 4)。この結果は、生体の環境変化に対応することが可能な、可塑性を保った線維芽細胞集団が存在することを意味しており、ストレスに対する応答能の違いは、心尖部切除領域との場所に依存する可能性だけでなく、線維芽細胞自体の由来の相違や、分化・成熟の不均一性によって生み出される可能性が示唆された。

### <結論>

本研究は、*Sall1* が心臓細胞運命決定に関わり、心筋誘導を引き起こすことを明らかにしただけでなく、心臓再生の新たなソースを見いだした。今後 *Sall1* を基盤とした心臓発生と再生現象に共通/相違のメカニズムの解明が期待される。

