

Editorial Comment

第3の心筋原基としての心外膜前駆細胞(epicardium-derived progenitor cell) —多様な分化能と心筋再生の可能性—

国立循環器病センター小児循環器診療部
白石 公

心臓を構成する細胞の主体は心収縮の機動力となる心筋細胞であるが、それ以外にも、心筋組織を支持するための線維芽細胞、心筋組織に血液を供給するための血管内皮細胞や血管平滑筋細胞、弁組織や中隔組織の間葉系細胞に分化する心内膜内皮細胞、心外膜を形成する心外膜上皮細胞、刺激伝導系細胞、神経節細胞など、心臓はさまざまな細胞群より成り立ちその機能を発揮している。それぞれの細胞の起源と分化のメカニズムを明らかにすることは、胎生期心臓の発生過程を知るのみならず、心不全、心筋梗塞、心筋炎、先天性心疾患などの種々の病的状態により欠落した細胞機能を再生させるうえで極めて重要である。

胎生初期心臓では、心臓管からは心筋細胞のみが供給され、線維芽細胞や血管内皮細胞は心外膜前駆細胞(epicardium-derived progenitor cell)に由来する。また大動脈および肺動脈基部の平滑筋細胞は心臓神経堤細胞(cardiac neural crest cell)に由来する(Fig. 1)。すなわち末梢の冠血管内皮細胞はすべて心外膜前駆細胞に由来するわけであるが、最後に形成される冠動脈開口部はどのようなメカニズムで形成されるのかは明らかではなかった。本誌に掲載された宮川-富田らの論文¹⁾は、ニワトリ-ウズラのキメラ作製により冠動脈開口部の細胞起源について詳細な検討が加えられた卓越した論文である。1)冠動脈開口部の血管内皮細胞は、心外膜前駆細胞だけに由来するのではなく、心臓神経堤細胞も関与すること、2)心臓神経堤細胞切除では冠動脈起始異常が高率に発生すること、また、3)細胞外基質であるtenascin Cが開口部の形成およびリモデリングに関与していること、以上を明確に示している。この研究は、総動脈幹症やFallot四徴症において高率に合併する単冠動脈、健常者にみられ突然死の原因となり得る冠動脈起始および走行異常、左冠動脈閉鎖症、BWG(Brand-White-Garland)症候群、などの病因を考えるうえでたいへん意義深い。

本稿では、心臓の間質細胞の起源としての心外膜前駆細胞について追記するとともに、マウスを用いてごく最近明らかになった事実、「第3の心筋細胞の起源としての心外膜前駆細胞」について概略を紹介する。

血管内皮、血管平滑筋、線維芽細胞の起源としての心外膜前駆細胞

心臓管下部の静脈洞付近より萌出する心外膜前駆組織(proepicardial organ)は、まず心臓管に沿ってシート状に広がり心外膜上皮を形成する(Fig. 1, 2A)。その後、心外膜上皮細胞は上皮-間葉形質転換(epithelial-mesenchymal transformation)を起こして心外膜下組織から心筋層に入り、やがて血管内皮、血管平滑筋、血管周囲細胞、線維芽細胞へと分化する(Fig. 1, 2C下)²⁾。初期の心臓管からは心筋細胞のみが供給されるので、大動脈平滑筋や大動脈-肺動脈中隔の間葉系細胞など頸部神経堤細胞に由来する部分および心内膜に由来する組織を除けば、胎生初期の心臓の間質細胞はすべて心外膜前駆細胞に由来する(Fig. 1)。

心外膜前駆細胞はさまざまな刺激因子により上皮-間葉形質転換を起こして、間質細胞へと分化する²⁾。actin重合蛋白の一つで、細胞外に分泌されて周囲の細胞の移動や遊走を調節するthymosin β 4(T β 4)は、心外膜前駆細胞の上皮-間葉形質転換と細胞遊走を促進し、血管内皮細胞の新生と心筋細胞の生存シグナルを賦活化する(Fig. 2C下)^{3, 4)}。またhelix-loop-helix型転写因子Ets1/Ets2も心外膜上皮の上皮-間葉形質転換を促進する(Fig. 2C下)⁵⁾。一方、vascular endothelial growth factor(VEGF)、fibroblast growth factor(FGF)は心外膜前駆細胞が間葉系細胞に形質転換した後に血管内皮細胞へ分化する過程を促進し^{5, 6)}、transforming growth factor β (TGF β)、platelet-derived growth factor-B(PDGF-B)、serum response factor(SRF)は、間葉系細胞が血管平滑筋細胞へと分化する過程を促進する(Fig. 2D下)^{5, 7, 8)}。

これらの事実に加えて、心外膜前駆細胞は心筋層のみならず心内膜下層や心内膜床組織まで遊走し、正常な心筋組織の構築形成や房室弁の形成にも関与することが報告され^{9, 10)}、その役割の多様性が次第に明らかとなってきた。そして2008年になり、心外膜前駆細胞は、これまでに述べた胎生期心臓の間葉系細胞を供給するのみならず、心室中隔を中心とした心筋細胞にも分化することが報告された^{11, 12)}。心外膜前駆細胞の運命を明らかにする

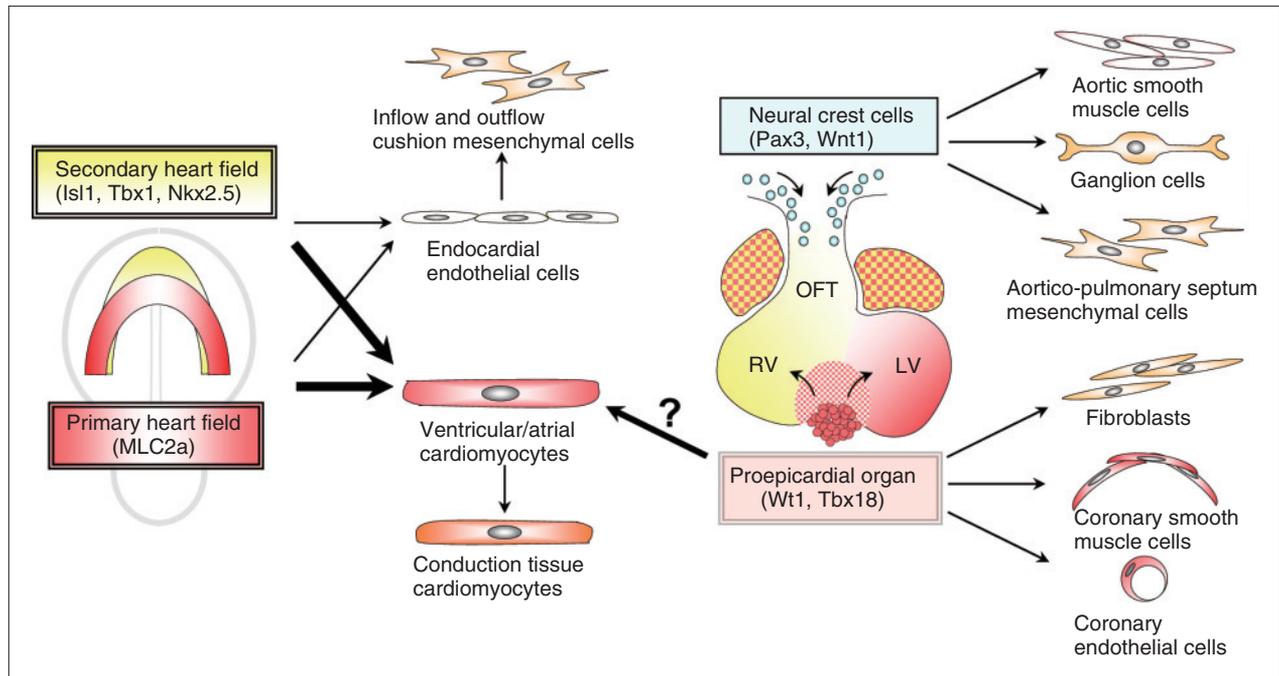


Fig. 1 Possible origins of cells in the embryonic heart tissue.
OFT, outflow tract; RV, right ventricle; LV, left ventricle

ことは、胎生期の心筋細胞の起源を考えるうえだけではなく、心筋細胞の新しい起源になり得る可能性があり、再生医学の見地から興味深い事実である。次にこれまで知られている心筋細胞の起源と本年報告された事実を概略する。

胎生期心筋細胞の新たな起源としての心外膜前駆組織

2000年までの心臓発生学では、両心室および両心房のすべての心筋細胞は側板中胚葉(lateral plate mesoderm)に由来すると考えられてきた¹³⁾。側板中胚葉の細胞は、近接する内胚葉組織からbone morphogenic protein(BMP)、FGF, sonic hedgehog(Shh)などの成長因子もしくは形態形成因子のシグナルを受け、Nkx2.5やTbx5などの転写因子および収縮蛋白MLC2aを発現して、将来心筋細胞へと運命付けられた心臓前駆細胞へ分化決定する^{13, 14)}。これら左右の心原基は次第に胚の正中へ向けて移動および癒合し、1本の心臓管を形成する。心臓管はactinやmyosinなどの心筋収縮蛋白を発現するようになり律動的な収縮を開始するとともに、右方へ屈曲し心ループを形成する。

2001年になると、心臓管の背側にあたる咽頭弓臓側中胚葉(splanchnic mesoderm)に、側板中胚葉とは異なった心臓前駆細胞が存在することが見いだされた¹⁵⁻¹⁷⁾。これらの細胞はLIM-homeodomain転写因子であるIsl1で標識され¹⁸⁾、流出路から心臓管に侵入して右心室および流出路の心筋細胞へと分化するとともに、流入路からも侵入して心房筋の広範囲と心房中隔の一部に分化する。この発見の結果、側板中胚葉は一次心臓領域(primary heart field)、咽頭弓臓側中胚葉は二次心臓領域(secondary heart field)と呼ばれるようになった。二次心臓領域の細胞は流出路においてt-box転写因子であるTbx1を発現し^{19, 20)}、22q11.2欠失症候群ではこの遺伝子の異常によりFallot四徴症や大動脈離断などの心臓大血管奇形が発症する。さらにIsl1陽性前駆細胞は生後の心臓にも見いだされ、それらの前駆細胞を単離培養すると、血管内皮、血管平滑筋、心筋細胞へと分化することも明らかにされた^{21, 22)}。このことにより、Isl1陽性細胞は、これまでに報告された骨髄由来の前駆細胞であるc-kit陽性Lin陰性細胞²³⁾、生後の心臓に存在する前駆細胞であるScal陽性細胞²⁴⁾やMDR1陽性細胞²⁵⁾と同様に、心筋、血管内皮、血管平滑筋の前駆細胞の一つとして、再生医療への可能性が示された。

一方、前述した心外膜前駆細胞による冠血管新生の研究が進むなか、成熟マウス心外膜においてもc-kit陽性

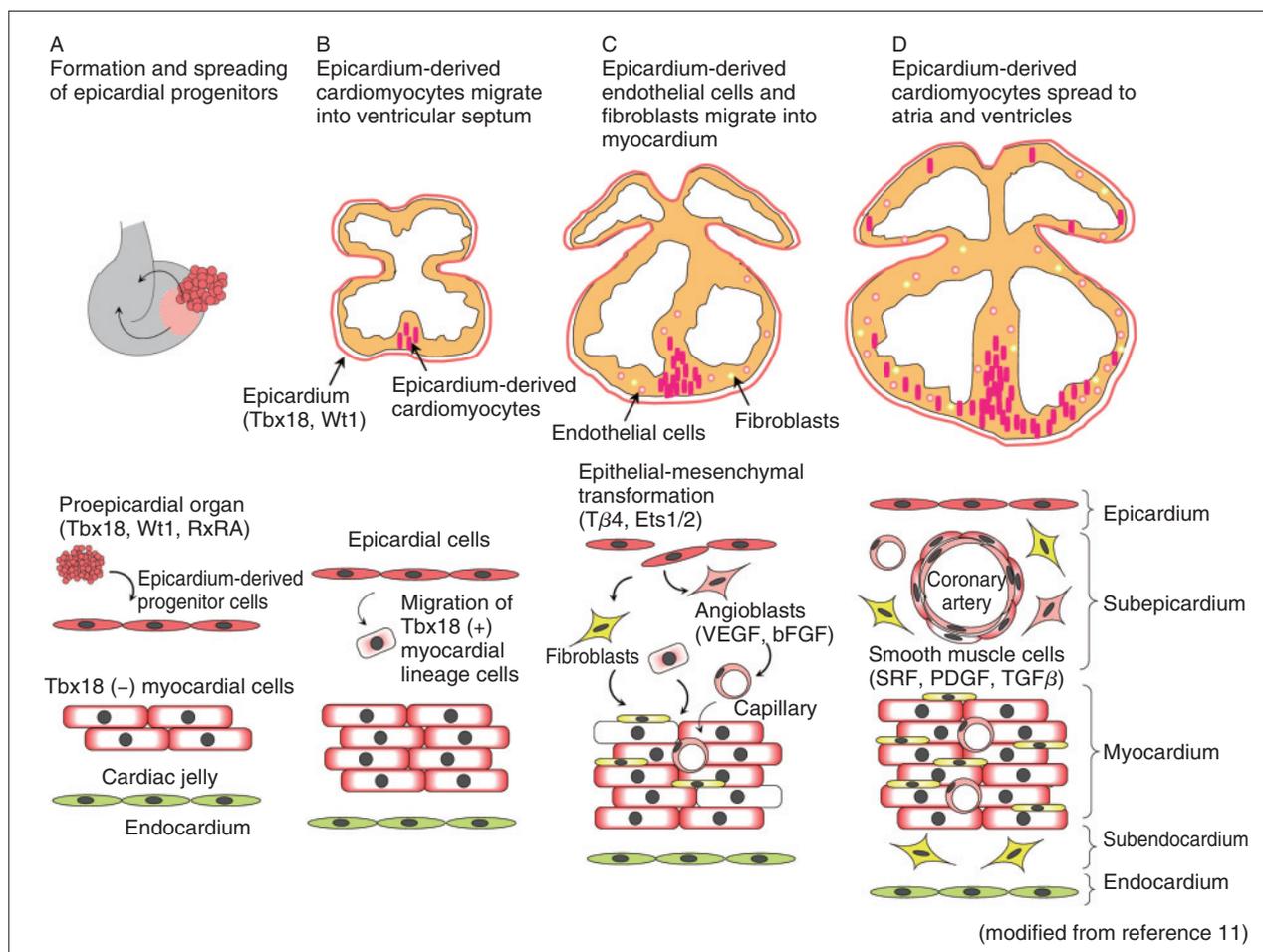


Fig. 2 Differentiation of proepicardial organ and epicardium-derived progenitor cells.
 A: Proepicardial organ spread and forms an epicardial sheet around the looping heart tube.
 B: Epicardium-derived progenitor cells near the ventricular septum migrate into the subepicardial space and give rise to myocardial lineage cells.
 C: Epicardium cells differentiate into fibroblasts and vascular endothelial cells by epithelial-mesenchymal transformation. Small capillaries are formed by a process of vasculogenesis.
 D: Epicardium-derived myocardial lineage progenitor cells fully differentiate into cardiomyocytes at the ventricles and atria. Small capillaries become mature coronary vessels surrounded with vascular smooth muscle cells.

CD34陽性の未分化な前駆細胞が存在することが示され、実験的に心筋梗塞を作製すると心外膜前駆細胞が反応性に増殖して梗塞部での血管新生を促進するとともに、一部は心筋細胞に特異的なマーカーGATA4を発現することが確認された²⁶⁾。また鶏胚の心外膜前駆組織を摘出して試験管内で培養すると、BMP2の刺激下で一部は心筋細胞に分化することが報告された²⁷⁾。そして心外膜前駆細胞が心筋細胞に分化する可能性が高まるなか、2008年に入り、t-box転写因子Tbx18やウィルス腫瘍抑制遺伝子Wt1を細胞マーカーとして用い、Cre-loxPシステムを応用した細胞系譜解析技術によって分化過程を詳細に追跡したところ、これらの前駆細胞は心室中隔を主体とした心室心筋細胞や心房筋にも分化することが明らかとなった(Fig. 2B~D)^{11, 12)}。またTbx18陽性細胞は、心筋細胞以外に血管平滑筋の大半と線維芽細胞の約30%に分化するが、血管内皮細胞には分化しないことも明らかとなった。さらにこの方法によって、房室弁の線維芽細胞もTbx18陽性前駆細胞に由来することも示された¹¹⁾。

このように、マウスにおいて、心外膜前駆細胞が心筋細胞に分化する事実が初めてin vivoで報告され、心外膜前駆細胞が胎児期における第3の心筋原基として認識された^{11, 12)}。しかしながら現時点では、生後の心外膜前駆細胞が実際に心筋細胞に分化するかどうかは明らかではない。またWt1陽性の心外膜前駆細胞はIs11, Nkx2.5陽性前

駆細胞と共有した起源をもつ可能性も示唆されており¹²⁾、両者の相違についてはさらなる研究成果が待たれる。一方、zebrafish成魚では心尖部を切り取っても欠損部分が心外膜に覆われた後に心筋組織が修復再生し²⁸⁾、この実験系を用いて心筋再生のメカニズムを明らかにする研究がなされてきたが、このとき再生する組織は、障害により賦活化される心外膜前駆細胞に由来し、FGFシグナルを介して分化が促進されることが報告されている²⁹⁾。以上に述べた研究結果をベースとして、心筋梗塞などでの障害部位において、心外膜前駆細胞が血管のみならず心筋細胞も修復する手段の一つとなる可能性が今後示されていくと考えられる。

心筋前駆細胞と再生医療

ヒトの生後の心臓にも心筋組織由来の幹細胞^{22, 24)}や骨髄由来の幹細胞²³⁾が存在し、心筋組織の恒常性の維持に働いている。しかしこれらの幹細胞は心筋梗塞など一度に大量の心筋細胞が欠落した際に十分心筋細胞を補えるだけのものではない³⁰⁾。先天性心疾患においても、右室型の単心室や繰り返し手術が行われた症例では、年齢とともに経時的に心機能低下が進行する³¹⁾。末期の心不全には心移植は有効な治療法ではあるが、脳死ドナーからの心移植が少なく、また小児間での心移植が困難な日本の現状では、薬物療法以外にも幹細胞移植³²⁾、幹細胞動員療法³³⁾、心筋シート移植³⁴⁾など、トランスレーショナル研究に基づく斬新な治療法が考慮されなければならない。2007年にYamanakaらのグループにより、ヒトの皮膚線維芽細胞に未分化性特異的転写因子Oct3/4, Sox2, 癌関連遺伝子Klf4, c-Myc遺伝子を導入すると、胎生幹細胞(embryonic stem cell)に酷似した性質をもつ未分化な細胞に脱分化することが証明され、iPS細胞(induced pluripotent cell: 人工多能性幹細胞)と名付けられた³⁵⁾。のちに癌遺伝子c-MycなしでもiPS細胞が得られることも報告され³⁶⁾、拒絶反応の心配のない、自己組織を用いた再生医療実現への期待が一気に高まった。iPS細胞は、分化すると一部はNkx2.5, MEF2c, TnTcを発現し自己拍動する心筋細胞様の表現型を示すが³⁵⁾、どのような性質の心筋細胞であるかについての細胞分子生物学的な検討と、実際の心臓で機能するかどうかの再生医療への応用を見据えた研究が今後必要となる。今回紹介した心外膜前駆細胞は、心筋、血管内皮、平滑筋幹細胞の一つとして将来再生医療に応用される可能性がある。生検などで心筋組織を採取して前駆細胞を単離増殖させることができる可能性もあるし、前駆細胞から心筋細胞をより有効に分化させる技術が開発されれば、細胞移植やシート形成などに応用可能である。心臓発生学と再生医学をハイブリッドさせ、成人の心不全とは異なった病態をもつ先天性心疾患の重症心不全症例においても、有効かつ安全に再生医療が実現できるよう、われわれも最新の知識を収集する必要があると考え、本稿を紹介した。

【参考文献】

- 1) 宮川-富田幸子, 杉村洋子, 中西敏雄, ほか: 心外膜原基由来細胞を制御するテネイシンCの検討. 日小循誌 2008; 24: 606-614
- 2) Lie-Venema H, van den Akker NM, Bax NA, et al: Origin, fate, and function of epicardium-derived cells (EPDCs) in normal and abnormal cardiac development. ScientificWorldJournal 2007; 7: 1777-1798
- 3) Smart N, Rossdeutsch A, Riley PR: Thymosin beta4 and angiogenesis: Modes of action and therapeutic potential. Angiogenesis 2007; 10: 229-241.
- 4) Smart N, Risebro CA, Melville AA, et al: Thymosin beta4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization. Nature 2007; 445: 177-182
- 5) Lie-Venema H, Gittenberger-de Groot AC, van Empel LJ, et al: Ets-1 and Ets-2 transcription factors are essential for normal coronary and myocardial development in chicken embryos. Circ Res 2003; 92: 749-756
- 6) Lavine KJ, Ornitz DM: Fibroblast growth factors and Hedgehogs: At the heart of the epicardial signaling center. Trends Genet 2008; 24: 33-40
- 7) Nelson TJ, Duncan SA, Misra RP: Conserved enhancer in the serum response factor promoter controls expression during early coronary vasculogenesis. Circ Res 2004; 94: 1059-1066
- 8) Olivey HE, Mundell NA, Austin AF, et al: Transforming growth factor-beta stimulates epithelial-mesenchymal transformation in the proepicardium. Dev Dyn 2006; 235: 50-59
- 9) Gittenberger-de Groot AC, Vrancken Peeters MP, Mentink MM, et al: Epicardium-derived cells contribute a novel population to the

- myocardial wall and the atrioventricular cushions. *Circ Res* 1998; **82**: 1043–1052
- 10) Eralp I, Lie-Venema H, DeRuiter MC, et al: Coronary artery and orifice development is associated with proper timing of epicardial outgrowth and correlated Fas-ligand-associated apoptosis patterns. *Circ Res* 2005; **96**: 526–534
 - 11) Cai CL, Martin JC, Sun Y, et al: A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature* 2008; **454**: 104–108
 - 12) Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, et al: Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* 2008; **454**: 109–113
 - 13) Srivastava D, Olson EN: A genetic blueprint for cardiac development. *Nature* 2000; **407**: 221–226
 - 14) Srivastava D: Making or breaking the heart: From lineage determination to morphogenesis. *Cell* 2006; **126**: 1037–1048
 - 15) 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* 2001; **238**: 97–109
 - 16) Kelly RG, Brown NA, Buckingham ME: The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev Cell* 2001; **1**: 435–440
 - 17) Waldo KL, Kumiski DH, Wallis KT, et al: Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development* 2001; **128**: 3179–3188
 - 18) 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* 2003; **5**: 877–889
 - 19) Hu T, Yamagishi H, Maeda J, et al: Tbx1 regulates fibroblast growth factors in the anterior heart field through a reinforcing autoregulatory loop involving forkhead transcription factors. *Development* 2004; **131**: 5491–5502
 - 20) Xu H, Morishima M, Wylie JN, et al: Tbx1 has a dual role in the morphogenesis of the cardiac outflow tract. *Development* 2004; **131**: 3217–3227
 - 21) Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, et al: Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 2005; **433**: 647–653
 - 22) Moretti A, Caron L, Nakano A, et al: Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell* 2006; **127**: 1151–1165
 - 23) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; **410**: 701–705
 - 24) Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, et al: Cardiac progenitor cells from adult myocardium: Homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**: 12313–12318
 - 25) Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, et al: Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 2002; **346**: 5–15
 - 26) Limana F, Zacheo A, Mocini D, et al: Identification of myocardial and vascular precursor cells in human and mouse epicardium. *Circ Res* 2007; **101**: 1255–1265
 - 27) Kruthof BP, van Wijk B, Somi S, et al: BMP and FGF regulate the differentiation of multipotential pericardial mesoderm into the myocardial or epicardial lineage. *Dev Biol* 2006; **295**: 507–522
 - 28) Poss KD, Wilson LG, Keating MT: Heart regeneration in zebrafish. *Science* 2002; **298**: 2188–2190
 - 29) Lepilina A, Coon AN, Kikuchi K, et al: A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell* 2006; **127**: 607–619
 - 30) Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al: Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004; **428**: 664–668
 - 31) Shaddy RE, Webb G: Applying heart failure guidelines to adult congenital heart disease patients. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2008; **6**: 165–174
 - 32) Passier R, van Laake LW, Mummery CL: Stem-cell-based therapy and lessons from the heart. *Nature* 2008; **453**: 322–329
 - 33) Tomita S, Ishida M, Nakatani T, et al: Bone marrow is a source of regenerated cardiomyocytes in doxorubicin-induced cardiomyopathy and granulocyte colony-stimulating factor enhances migration of bone marrow cells and attenuates cardiotoxicity of doxorubicin under electron microscopy. *J Heart Lung Transplant* 2004; **23**: 577–584
 - 34) Miyagawa S, Sawa Y, Sakakida S, et al: Tissue cardiomyoplasty using bioengineered contractile cardiomyocyte sheets to repair damaged myocardium: Their integration with recipient myocardium. *Transplantation* 2005; **80**: 1586–1595
 - 35) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; **131**: 861–872
 - 36) Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al: Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008; **26**: 101–106