

解説

胎生期心内膜における造血機能の発見とその意義

重田 文子 中野 治子 中野 敦

Key words : 胎生期心内膜, 心臓組織定住マクロファージ, 弁形成

主に骨髄で行われる成体の造血と異なり, 胎生期には, 卵黄嚢や大動脈など複数の器官が造血機能を有している。この事実はよく知られているが, なぜ造血が複数の器官で起こる必要があるのか(あるいは理由などないのか)は古くからの謎であった。近年筆者らは, 胚発生期の一時的に, 心内膜も血球細胞産生機能を持つことを発見し¹⁾, 心臓で起こる造血の大半を占めるマクロファージは, 心臓弁の成熟に必須な細胞集団であることを明らかにした²⁾。これは, 胎生期の一時的局所的な造血機能が, その局所組織の形態形成を担うマクロファージの産生に重要であることを証明した初めての報告である。

I 胎生期心内膜は血球産生能を有する

胎生期の心臓が造血能を持つことは, ハエの心臓原基で確認されている。そこで筆者らは, 脊椎動物でも同様の現象が保存されていると考え, マウス胎児心臓の造血能を *ex vivo* で検討した。循環血の混入を避けるため, 心拍による体循環が始まる前の胎生 8.0 日齢 (体節数 1-5) マウス胚, および *NCX1* 遺伝子欠損による心臓拍動欠如モデルマウス胚から心臓・傍大動脈内臓葉・卵黄嚢をそれぞれ単離して器官培養を行い, 造血コロニー形成アッセイで血球細胞分化能の有無を解析し

た。その結果, 既に造血器官として知られている傍大動脈内臓葉・卵黄嚢と同様に, 心臓の器官培養からも血球コロニー形成が観察され, 心臓にも造血能があることが証明された (図 1A)。

次に心臓内の血球産生部位を特定するため, 血球前駆細胞の表面マーカーである CD41 の局在を胎生 9.5 日齢の心臓内で解析した。すると, 流出路と心房における内皮細胞 (CD31 陽性内皮細胞) の一部が CD41 を発現しており, 心臓での血球産生は心内膜で起こっていると考えられた (図 1B, C)。更に詳細な解析から, CD31 CD41 二重陽性血球産生型心内膜は図 1D のように分布しており, 胎生 9.5-11.0 日齢の流出路と房室管の心内膜床 (endocardial cushion) 部分が主であった。また, この造血機能は転写因子 *Nkx2-5* や *Isl1*, 更に *Runx1* に制御されていることが確認された¹⁾。

II 血球産生型心内膜の活性は弁形成の始まりと時間的・空間的に一致する

前項で述べたとおり, 心内膜細胞の血球産生能は主に胎生 9.5-11.0 日齢の心内膜床部分に認められることが確認されたが, なぜ血球産生心内膜はこの時期にこの場所で活性化する必要があるのだろうか? 筆者らは, それが弁形成の開始と一致していることに着目した。この時期, 心内膜床の

Intracardiac hematopoiesis and its role

Shigeta Ayako : Department of Molecular, Cell, and Developmental Biology, University of California, Los Angeles, 千葉大学大学院医学研究院呼吸器内科学 (〒260-8670 千葉県千葉市中央区玄鼻 1-8-1)

Nakano Haruko, Nakano Atsushi : Department of Molecular, Cell, and Developmental Biology, University of California, Los Angeles

0370-9531/02/¥500/ 論文/JCOPY

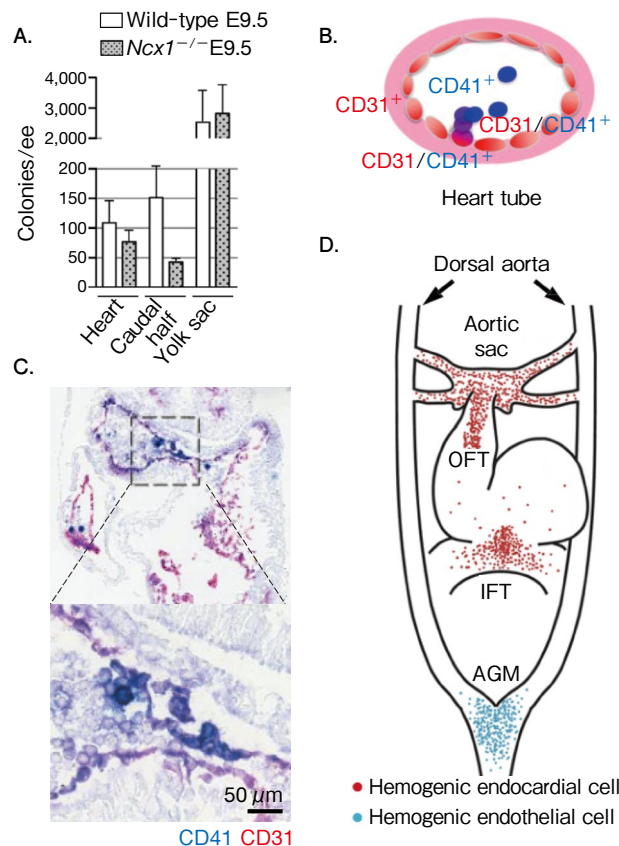


図1 胎生期の心内膜における造血能

- A. 胎生9.5日齢における血球コロニー形成能を、心臓、傍大動脈葉、卵黄嚢からの器官培養で、正常マウス胚、および *NCX1* 遺伝子欠損による心拍動欠如モデルマウス胚と比較したグラフ。
- B. 胎生期心内膜における造血能の模式図。
- C. 胎生9.5日齢心内膜の造血能を示す免疫組織染色。
- D. 胎生期心内膜および傍大動脈葉における造血能の模式図。

細胞は内皮間葉転換によって間葉系細胞に変化し、この間葉系細胞の集簇により細胞に富んだ厚い初期の弁が形成される。そして胎児期や新生児期を経て、細胞成分に乏しい薄い成熟した弁へ変化していく。この成熟の過程において、弁原基にはアポトーシス細胞が確認されているが³⁾、これらアポトーシス細胞がどのように除去されていくのかはいまだ明らかになっていない。心内膜における血球産生がアポトーシス細胞出現の直前に起こることから、筆者らは、弁のリモデリングを担う心臓組織定住マクロファージが血球産生型心内膜細胞に由来すると考えた。

Ⅲ 血球産生型心内膜からはマクロファージが産生される

第Ⅱ項で述べた仮説を証明するため、まずは血球産生型心内膜からマクロファージが産生され得るかを確かめた。第Ⅰ項と同様に胎生8.0日齢と *NCX1* 遺伝子欠損マウス胎生10.5日齢のマウス胚から心臓・傍大動脈内臓葉・卵黄嚢・脳それぞれを器官培養し、造血コロニー形成アッセイを行った。脳以外すべての組織由来細胞から血球コロニーが産生されたが、傍大動脈内臓葉・卵黄嚢に比して、心臓由来細胞からはマクロファージが有意に多く産生されていた(図2A)。以上より、胎生8.0-10.5日齢の心臓からはマクロファージが産生されることに加え、この時期の心臓(心内

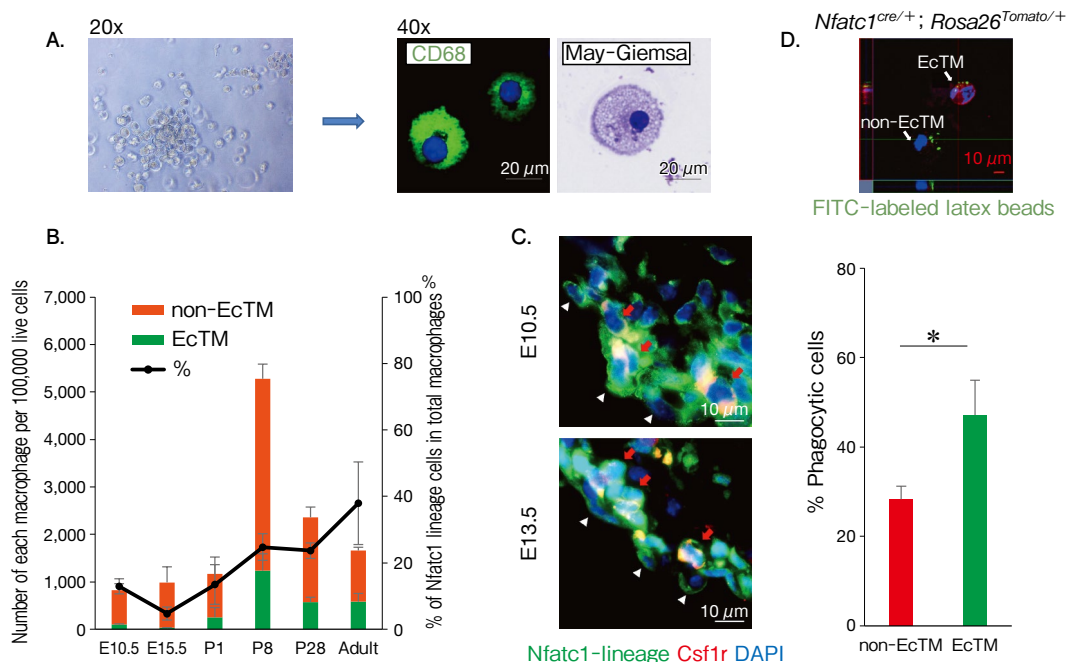


図2 心内膜由来組織定住マクロファージの存在とその機能

- A. 左：胎生 8.0 日齢の心臓由来細胞から産生されたコロニー。右：左側コロニーから採取した細胞の CD68 免疫蛍光染色と May-giemsa 染色。
- B. 心臓組織定住マクロファージ内に占める割合とその経時的推移。
- C. 胎生 10.5 日齢と胎生 13.5 日齢の心内膜床部分における EcTM の分布を示す免疫蛍光染色。
- D. 上：Phagocytosis assay の写真。下：EcTM と non-EcTM における貪食能の比較。

膜)は他の造血部位に比べてマクロファージ産生に富んでいることが示唆された。

次に *Nfatc1* をマーカーとして心内膜細胞の系譜解析を行うことで、心内膜由来マクロファージの同定を試みた。*Nfatc1* は胎生 9.5–13.5 日齢の心内膜に特異的に発現しており、*Nfatc1*-Cre knock-in マウスを用いた心内膜細胞標識は感度と特異度に優れているため、心内膜の系譜解析に汎用されている⁴⁾。*Nfatc1*^{Cre/+};*R26*^{reporter/+}マウス心臓において、*CD45*⁺*CD11b*⁺*F4/80*⁺をマクロファージと定義し、そのなかに lineage 陽性細胞(心内膜由来)が存在するかどうかをフローサイトメトリー法で解析した。

CD45⁺*CD11b*⁺*F4/80*⁺lineage⁺細胞は最も早い時期では胎生 9.5 日齢から心臓内に確認されたものの、その時期の卵黄嚢・傍大動脈内臓葉・肝臓・血液には確認されなかったことから、他臓器由来でなく心内膜自体から発生するマクロファージ(心内膜由来心臓組織定住マクロファージ, endo-

carcially derived cardiac tissue macrophage; EcTM)と考えた。胎生期には心臓内マクロファージ全体の 2.6–17.4%が EcTM であり、生後も更にその割合は増え続け、成体では 37.9%が EcTM となっていた(図 2B)。

更に、*Nfatc1*^{Cre/+};*R26*^{reporter/+}マウス心臓内における *Csf1r*, *CD68*, *CD206*, *F4/80*(マクロファージマーカー)発現を調べることで、心臓内における EcTM の主な存在領域を確認した。胎生 10.5 と 13.5 日齢の心内膜床部分には心内膜由来細胞を示す lineage 陽性細胞が集簇しており、そのなかの一部は *Csf1r* 陽性であった(図 2C 赤矢印)。EcTM は一様に心内膜層直下に認められ、心内膜からマクロファージへ分化したのちに組織内部へ侵入していくことが示唆された。心臓全体を観察すると、胎生期には心内膜床と心房領域、生後から成体にかけては大動脈弁と僧帽弁領域に EcTM が多く確認された。

以上より、他組織からではなく心内膜自体から

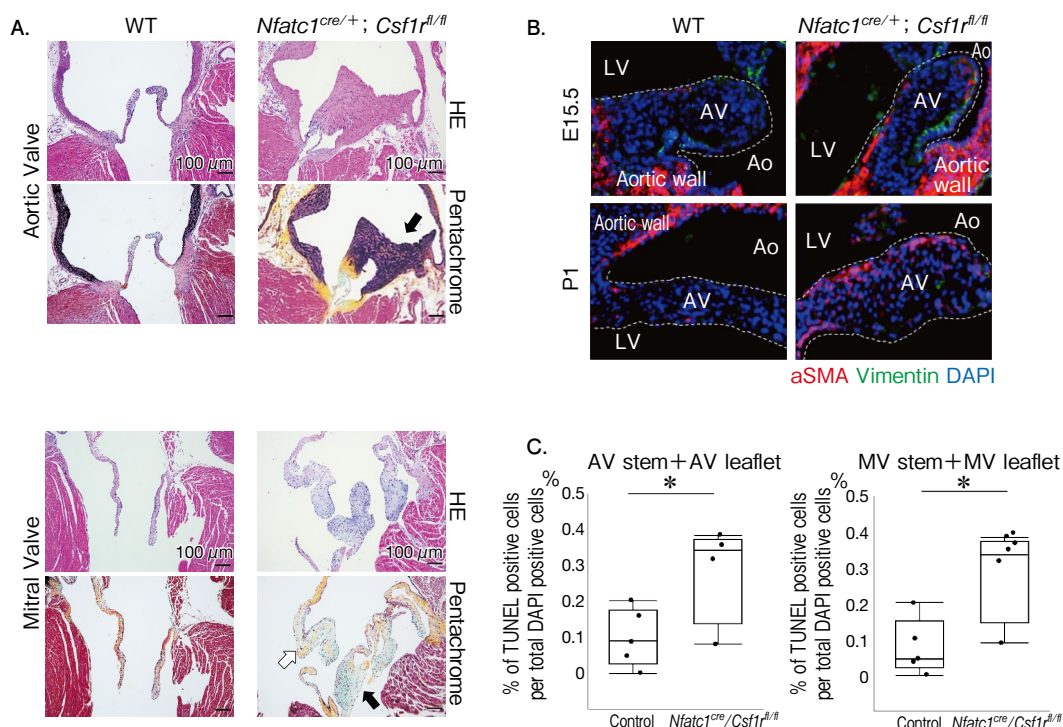


図3 EcTM欠損マウスにおける形態学的・分子病態学的変化

- A. Wild type と EcTM 欠損マウスの大動脈弁と僧帽弁。上：Hematoxylin-eosin 染色。下：Pentachrome 染色。
 B. Wild type と EcTM 欠損マウスの大動脈弁における筋線維芽細胞の分布を示す免疫蛍光染色。上：胎生 15.5 日齢。
 下：生後 1 日。
 C. 生後 1 日目の Wild type と EcTM 欠損マウスの大動脈弁と僧帽弁領域における TUNEL 陽性細胞の比較。

産生されるマクロファージの存在が明らかになり、それらが心臓内、特に弁領域に多く存在していることが確認された。

IV 心内膜由来マクロファージは強い食食能を有する

次に、EcTMの機能的特徴を解析した。古典的にマクロファージはM1(炎症性)とM2(抗炎症性・組織修復)に分けられるが、EcTMはLy6C^{low}CD206⁺というM2マクロファージの特徴を示していた。また、より詳細な心臓マクロファージ分類⁵⁾を用いると、Ly6C^{low}MHCII^{low}という食食作用の強いマクロファージの特徴を示していた。RNAシーケンス解析を用いて、EcTMと心内膜由来ではない一般的な心臓組織定住マクロファージ(non endocardially derived cardiac tissue macrophage: non-EcTM)の機能的特徴を比較すると、EcTMには抗原提示・ライソソーム・

ファゴソームに関連する遺伝子がnon-EcTMに比べて有意に多く発現していた。更に、食食活性解析を用いて食食能の比較を行うと、EcTMはnon-EcTMに比べて有意に食食能力に優れていた(図2D)。

以上より、EcTMの機能的特徴として、強い食食能力を持つことが示された。

V 心内膜由来マクロファージは弁発生に必須な細胞である

第II項で述べた「心内膜由来のマクロファージが弁のリモデリング過程で生じた不要な細胞の除去を担っている」という仮説に対して、心内膜からマクロファージが産生されることが第III項で、そのマクロファージの機能的特徴が強い食食能力を有することが第IV項で示された。そこで最後に、EcTMが弁形成において必須なマクロファージであるかどうかを調べた。

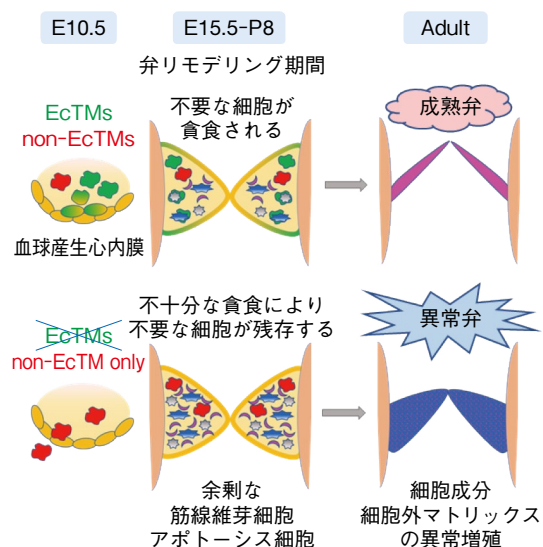


図4 弁形成における心内膜由来組織定住マクロファージの役割を示した模式図

Colony-stimulating factor 1 (Csf1r) はマクロファージに発現する細胞表面受容体の一つであり、マクロファージの生存・分化・増殖に中心的な役割を果たしている。そして、Csf1r のノックアウトマウスではマクロファージの欠如が確認されている⁶⁾。そこで EcTM のみを特異的に欠如する *Nfatc1^{cre/+}; Csf1r^{fl/fl}* マウスを作製した。

Nfatc1^{cre/+}; Csf1r^{fl/fl} マウスはコントロールマウスに比べて、離乳期前死亡が有意に多かった。離乳期前に死亡に至らなかった *Nfatc1^{cre/+}; Csf1r^{fl/fl}* 成体マウスの心臓は拡大しており、大動脈弁では細胞成分と弾性線維成分の異常増殖を伴う弁肥厚を、僧帽弁では細胞成分と膠原線維/ムチン成分の異常増殖を伴う粘液腺腫様変化を呈しており、弁形成過程におけるリモデリング異常が示唆された(図3A)。

次に、*Nfatc1^{cre/+}; Csf1r^{fl/fl}* マウスの弁形成過程における異常出現時期を調べた。生後1, 8, 28日齢で観察を行うと、明らかな弁肥厚は生後8日齢から認められた。しかし、弁内の α -Smooth muscle actin (α -SMA) と vimentin 発現を調べると、*Nfatc1^{cre/+}; Csf1r^{fl/fl}* マウス胎生15.5日齢では既に α -SMA と vimentin 両方を発現している細胞がコントロールに比べて有意に多く認められた(図3B)。正常な弁形成の過程では速やかに線維

芽細胞に変化していく筋線維芽細胞が、EcTMの欠如によって弁内に長期間存在し続け、余剰な細胞外マトリックスを産生し続けていることが示唆された。また、*Nfatc1^{cre/+}; Csf1r^{fl/fl}* マウス生後1日齢の弁内には TUNEL 陽性細胞が有意に多く認められ、EcTM欠如により不要なアポトーシス細胞が除去しきれない状態に陥っていることも示唆された(図3C)。つまり、形態学的変化が認められる前の段階でも、弁内では既に遺伝子発現の変化は始まっており、その結果としてその後に細胞成分や細胞外マトリックス成分の異常増殖を伴う弁肥厚に至ることが考えられた。

Nfatc1^{cre/+}; Csf1r^{fl/fl} マウスの他の臓器においてはコントロールと比べて明らかな異常は認められなかった。また、*Nfatc1^{cre/+}; Csf1r^{fl/fl}* マウスの心臓は、EcTMが欠如している分、non-EcTMの数を増やすことでコントロールと同程度のマクロファージ数を保っていた。それにもかかわらず、弁形成異常を来しているという事実から、EcTMは弁形成において必須なマクロファージであり、その機能はnon-EcTMでは補いきれない心臓特異的な機能を有している細胞集団であると考えられた。

今回の内容をまとめると図4のようになる。胎生9.5日齢より活性化される血球産生心内膜の役割は、弁形成に必須な心臓組織定住マクロファージを産生することである。これらマクロファージは、弁のリモデリング過程で生じる不要な細胞を貪食しながら弁の成熟を促しており、その機能は他のマクロファージでは代用できない。以上より、当初筆者らが立てた仮説は正しいことが証明された。

おわりに

これまで組織定住マクロファージの起源は、卵黄囊および胎児肝に生着した卵黄囊由来の造血幹・前駆細胞であると考えられてきた。今回筆者らは、心臓弁のリモデリングに必要なマクロファージの一部は心臓自体で形成されることを明らかにした。この発見は組織定住マクロファージ研究に2つの大きな方向性を示すものである。1つめに、本研究は局所の造血メカニズムに依存し

た局所形態形成メカニズムの最初の例であり、他の臓器・器官にも同様のメカニズムが存在する可能性があること。2 つめに、本研究は先天性心疾患の一部がマクロファージ欠損に起因する可能性を示した最初の例であること。今後の更なる研究の発展に期待したい。

●文 献

- 1) Nakano H, Liu X, Arshi A et al : *Nat Commun.* 4 : 1564, 2013
- 2) Shigeta A, Huang V, Zuo J et al : *Dev Cell.* 48 : 617-630. e3, 2019
- 3) Aikawa E, Whittaker P, Farber M et al : *Circulation.* 113 : 1344-1352, 2006
- 4) Zhou B, Wu B, Tompkins KL et al : *Development.* 132 : 1137-1146, 2005
- 5) Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ : *Immunity.* 41 : 21-35, 2014
- 6) Dai XM, Ryan GR, Hapel AJ et al : *Blood.* 99 : 111-120, 2002