慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	いのちの作り方、心臓の作り方
Sub Title	The experimental procedures to create life and transplantable heart
Author	黒田, 裕樹(Kuroda, Hiroki) 岩宮, 貴紘(Iwamiya, Takahiro) 森本, 健太(Morimoto, Kenta)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2015
Jtitle	Keio SFC journal Vol.15, No.1 (2015.) ,p.262- 282
JaLC DOI	10.14991/003.00150001-0262
Abstract	我々が属する脊椎動物の体が, 球体である卵からどのように形成されてくるのかについて, 我々の最新の発生生物学の研究成果を解説する。まず, 我々が発見した脊椎動物の初期発生過程の中で最初に形成される組織である脊索の形成に必要不可欠な分子を示す。次に, 脊椎動物において原腸胚初期に現れるオーガナイザー領域の重要性と, この領域の人工的誘導系を用いた人工生命体形成の可能性を紹介する。最後に, 脊椎動物に関する発生学の応用的分野として, 万能性を有する細胞を用いた試験管内での心臓形成研究の現状を報告する。
Notes	特集 世界を救え : SFCバイオの挑戦#招待論文#第3章 SFCが関連するおもしろ生命科学
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=0402-1501-0262

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

［招待論文］

いのちの作り方、心臓の作り方

The Experimental Procedures to Create Life and Transplantable Heart

黒田 裕樹
慶應義塾大学環境情報学部准教授

Hiroki Kuroda
Associate Professor, Faculty of Environment and Information Studies, Keio University

岩宮 貴紘
慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科研究員

Takahiro Iwamiya
Project Researcher, Graduate School of Media and Governance, Keio University

森本 健太
慶應義塾大学環境情報学部 4 年

Kenta Morimoto
Fourth year, Faculty of Environment and Information Studies, Keio University

Abstract:　我々が属する脊椎動物の体が、球体である卵からどのように形成されてくるのかについて、我々の最新の発生生物学の研究成果を解説する。まず、我々が発見した脊椎動物の初期発生過程の中で最初に形成される組織である脊索の形成に必要不可欠な分子を示す。次に、脊椎動物において原腸胚初期に現れるオーガナイザー領域の重要性と、この領域の人工的誘導系を用いた人工生命体形成の可能性を紹介する。最後に、脊椎動物に関する発生学の応用的分野として、万能性を有する細胞を用いた試験管内での心臓形成研究の現状を報告する。

In this study, we would particularly like to mention of our recent findings about the body plan in vertebrates. First topic is about the key molecule of the sorting mechanism of notochord, which is the most indispensable tissue for vertebrates. Second topic is about the induction system of organizer, which is appeared at the dorsal lip site in early gastrula embryo and functions as a central player of early embryogenesis of vertebrates. Last topic is about the cardiac formation using pluripotent stem cells with utilizable cardiac fibroblast, which is artificially developed in our recent assays.

Keywords: 脊椎動物、脊索、オーガナイザー、分化万能性幹細胞、心臓線維芽細胞
vertebrates, notochord, organizer, pluripotent stem cells, cardiac fibroblast

1　はじめに

漫画家、藤子･F･不二雄氏の最も有名な著作である「ドラえもん」の第 8 巻に、実に興味深い話が登場する。22 世紀の世界から来たロボットであるドラえもんの四次元ポケットから出てくるのは「人間製造機」という機械（Fujiko, 1975）。これは、私たちの生活の中で用いられるヒトの体の構成成分と同じ分子・元素を有する物質を材料として、生きた人間の体を造ってしまうというものだ。主人公ののび太君は、せっけん 1 個（脂肪）、くぎ 1 本（鉄）、マッチ 100 本（リン）、そして鉛筆 450 本（炭素）を調達し、機械に放り込む。機械はゴトゴトと音をならし、ついには 3 kg の人間が誕生する。機械の中で行われている反応は、材料が分子・元素レベルまで還元され、DNA に刻まれた人体を形づくる設計図に従って再構築される、という寸法だろうか。これは現在の科学力では遠く及ばない漫画の世界の話であるが、もし、このような技術が完成されたとすれば、生物学の学問領域のひとつである「発生学」はほぼ完結したことになる。なぜなら、複雑な多細胞生物の形がどのように形成されるのかについて、その設計図と構築計画（あわせてボディプラン）を追求していく学問領域が「発生学」であるからだ。その解明に唯一的な対象も画一的な手法もないため、生物学者の中でも発生学者は特に多種多様となる傾向がある。

ボディプランは地球上に存在する単細胞生物を含めた全ての生物にそれぞれ別のものが存在する。中学 2 年生の理科の教科書にも掲載されている単細胞生物であるゾウリムシ、ミドリムシ、ミカヅキモ、そしてアメーバだけを比較しても、それぞれ全く違う形をしている。これらは、生物学的には細胞に核のある真核生物という部類に属し、細胞内骨格という細胞内の仕組みを利用して、単細胞にも拘わらず非常に複雑な形状が維持されている。一般的にさらに単純であると考えられている細胞核も有さない原核生物ではどうだろうか。原核生物は一部の極めて例外的な意見はあるが（Kushige *et al*., 2013）、原則として全てが単細胞生物である。この原核生物でもその形状の違いから、大腸菌などの「桿菌」、スピロヘータに代表される「らせん菌」、そしてブドウ球菌などに代表される「球菌」などに分類されている。この原核生物が持つ形態の多様性は 17 世紀、最初に微生物を発見したとされるオランダ人のレ

ーウェンフックの書いたスケッチにも記録されている（Dobell, 1932）。これらをボディプランとして捉えて研究した例は少ないが、これも生物学的には非常に意義深い研究対象とも言えるだろう。

分類学の第一段階の分類基準として頻用されるホイタッカーの五界説に従うと（Whittaker, 1969）、多細胞生物は動物界、植物界、菌界、そして原生生物界の 4 つの界にまたがって存在する（少なくとも前者二つは全て多細胞生物である）。現在、報告されているだけで、この 4 つの界には合計数百万種の生物が所属している。その全ての場合を対象としてボディプランを明らかにしようとすることは不可能だ。それ故、殆どの発生学者らはモデル生物に対して、特定の時期について、独自の基準や目標を設定してボディプランの解明に取り組むことになる。当然、我々ヒトが属する脊椎動物は非常に魅力的な対象であり、特に医学に関係する内容に対しては実学的価値が極めて高いものになる。それ故、脊椎動物以外の生物種におけるボディプランも極めて重要なものであると大いに認めるところであるが、本論文では限定された頁数を理由に紹介対象をあえて脊椎動物に絞りたい。特に脊椎動物の初期発生段階の中でも最初に周辺の細胞群から切り離されてできる脊索がどのように形成されるのか、また脊索になる細胞は元々どのような性質を有しており、その背景はいかなるものかを述べていく。また、近年の日本生物界の最大の発見とも言われる iPS（induced pluripotent stem）細胞を用いた臓器形成の代表として、どのようにすれば iPS 細胞から心臓となる細胞群を誘導することができ、最終的に心臓になるために何が必要になるのかについて解説していく。

2　脊索がなければ脊椎動物は成り立たない

2.1　脊索とは何か

分類学では界＞門＞綱（こう）＞目＞科＞属＞種という順番に、その分類度合いは細分化されていく。ヒトはもちろん動物界の生物であるが、門レベルでは脊索動物門に属している。最後まで言い進めると哺乳綱＞霊長目＞ヒト科＞ヒト属＞ヒト、となる。脊椎動物には哺乳綱の他に、鳥綱、両生綱、爬虫綱、硬骨魚綱、軟骨魚綱そして無顎綱などが含まれている（図 1）。これら

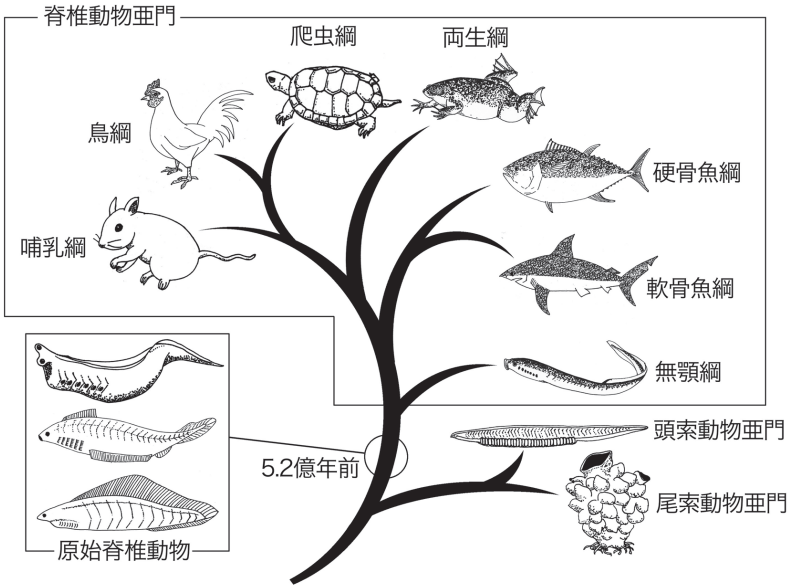

図 1　脊索動物門の系統樹

脊椎動物亜門に頭索動物亜門（図はナメクジウオ）と尾索動物亜門（図はホヤ）を加えて脊索動物門となる。これらの生物は全て脊索を持つが、脊索細胞が組織化するために細胞接着分子 AXPC が用いられるのは脊椎動物亜門の場合のみである。5.2 億年前に棲息していたと考えられている原始脊椎動物のメタスプリジーナ（上：*Metaspriggina*）、ミロクンミンギア（中央：*Myllokunmingia*）、そしてハイコウイクティス（下：*Haikouichthys*）らも AXPC を有していたかもしれない。各動物のイラストは全て黒田による手描。

はまとめて脊椎動物亜門と呼ばれている。脊椎動物亜門に尾索動物亜門（ホヤやサルパなどが属する）や頭索動物亜門（ナメクジウオなどが属する）などを併せて初めて脊索動物門の全体像ができあがる。つまり、脊椎動物に属する生物は全て脊索という同類項で結ばれるわけだ。言葉だけが先行してしまったが、さて脊索とは何なのであろうか。

脊椎動物の胚を卵の段階から、将来の頭尾軸に沿って輪切りにして観察することができたとすれば、最初に確認できる局部的かつ独立した部位は将来の背中にあたる領域の中央に形成される小さな丸い領域であろう。これが脊索である（図 2A）。大きな柔らかく割れないバルーンの中に伸縮する物干し

竿が入っていたとして、それがゆっくりと伸びていったとすればどうなるであろうか。バルーンはその総体積は変化させずに、物干し竿が伸びる方向に伸びていくことになろう。この伸縮物干し竿のごとく脊索は将来の頭尾軸に沿って伸びていく。この時の脊索を含めた背側中胚葉領域の細胞群が示す挙動は収斂伸縮運動（コンバージェント・エキステンジョン）として知られる(reviewed in Tada and Heisenberg, 2012)。胚の全体像はバルーンの外形と同じく、この収斂伸縮運動に引っ張られて伸びていくわけである。つまり、脊椎動物の多くが頭尾軸に伸びた構造をしている訳であるが、その最初の原動力となるのが脊索の存在であると言えるだろう。もっと平易な言い方をするならば、脊椎動物の胚が伸びるために脊索が活躍すると言える。太った人であれ、痩せた人であれ、人生のごく最初に母親の胎内で、脊索に引っ張られて細長く伸びるプログラムを体験しているわけだ。脊索の働きはそれだけではない。脊索領域では、周りの細胞群の発生運命に大きな影響を与えるタンパク質が数多く分泌される。例えば、ソニックヘッジホッグ(Shh)や Wnt11 などの受容体に結合して働くリガンドタンパク質はもちろん(Echelard *et al*., 1993; Makita *et al*., 1998)、特定のリガンドタンパク質に結合してその働きを阻害するアンタゴニストであるコーディン(chordin)やノギン(noggin)なども分泌されている(Sasai *et al*., 1994; Smith and Harland, 1992)。これらの存在が、脊椎動物の胚の背中の領域において、神経管（将来の脊髄や中枢神経系になる）や体節（骨や筋肉になる）を特徴づけることになる。つまり、脊索は脊椎動物の背中の領域の代表的な構造を誘導しながら、胚全体を引き伸ばしていくという働きを担うわけである。しかし、脊索のありがたさはそれだけでは終わらない。一定の役割を果たすと、脊索は細胞内構造体である液胞（一般的に動物細胞の殆どは液胞を有さないにも関わらず）に大量の水分を吸収させ、膨張する。その結果、細胞の体積のほぼ全てが液胞に支配されるようになり、それでもさらに細胞膜を押しつけながら、脊索領域は細胞膜の維持が可能な限界まで大きく膨らんでいく。最終的には脊索領域は細胞膜と液胞の膜だけで網目状になった組織になる(reviewed in Stemple, 2005)。この最終形態の脊索はまるでスポンジのように軽く、単独培養すれば試験管内をフワフワと漂う。最終形態と述べたのは、その後に脊索は時期が来れば、消滅する

からだ。脊索が消滅してできた空間には、神経管が居座るようになり、その周りには体節が取り巻くことになる。前者は脊髄となり、後者の一部は脊椎骨となり、かくして脊椎ができる次第だ。つまり、脊椎動物がその最大の特徴である脊椎を持つためには、脊索によるお膳立てが必要不可欠なのだ。脊索がなければ、もはや胚は伸びることもできず、重要な背側組織もまともに形成されない。稚魚が卵から孵化するとか、赤ん坊が母体から出産されるとか、その遥か前の段階で生物個体として成立しないことになるのだ。仮に、脊索に問題が生じる病気があるとすれば、胎児にすら至らない遙か前の段階において発生は確実に停止するので、人間社会で問題として認識されるには至るまい。脊索の異常はもはや「病気」にすらなり得ないのだ。それくらい脊椎動物のボディプランにおいて根元的な組織が脊索なのである。

2.2　予定脊索細胞を集合させる分子 AXPC

脊索は中胚葉の一部である。中胚葉は外胚葉に囲まれた領域として内胚葉とは独立して存在することになる。その中胚葉の最も正中線 (からだの中央になる線) 辺りに存在する一握りの細胞が将来の脊索となる (図 2A)。この過程を観察するために、脊椎動物のモデル生物であるアフリカツメガエル (図 1 の両生綱に示したイラスト参照) の胚を用いたシステムは最も扱い易い。なぜなら、試験管内で外胚葉の細胞を特定の濃度の中胚葉誘導物質に晒すことによって、全て脊索細胞に分化させる手法が確立されているからだ (図 2B)。具体的にはツメガエルの胞胚期の外胚葉細胞をカルシウムイオンとマグネシウムイオンの非存在下で培養すると細胞同士の接着がなくなり、細胞自身は生きたまま、バラバラに解離する。その培養液に 1 ng/ml の濃度になるようにアクチビンというタンパク質を投与して 1 時間培養する。尚、アクチビンは簡易的に用いられる中胚葉誘導物質として有名な物質である (Asashima *et al*., 1990)。その後、上記の両イオンを含む培養液に戻して解離した細胞を再集合させてやると、集まった細胞群 (再集合体) は脊索に分化するのだ (図 2B, Kuroda *et al*., 1999)。つまり、予め、将来脊索になる細胞を試験管内で任意の量だけ準備することができることになる。生物学の世界では細胞や分子の運命や軌跡を観察するために蛍光化学物質が用いられることが多い。下村

脩博士が発見した緑色蛍光色素 GFP (green fluorescent protein) はその代表格である (Shimomura, 2009; Sanders and Jackson, 2009)。脊索に分化する細胞も蛍光色素を用いて、挙動を観察することが可能になる。我々は赤い蛍光色素で標識された予定脊索細胞を緑で標識した別の発生運命を帯びた細胞群と共に混ぜ合わせて、培養した (図 2C の左側)。その結果、予定脊索細胞はどのような細胞群と混ぜ合わせた場合も、培養片の中央領域に集合すること

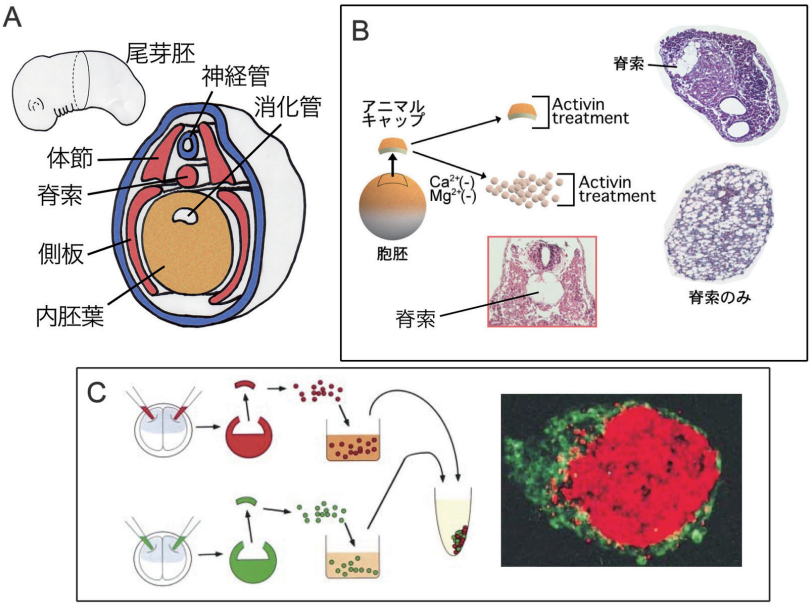

図 2　脊索になる細胞同士が示す強い接着能力によって脊索は正中線に集合する

(A) 尾芽胚の断面図。脊索は神経管、体節、そして消化管に囲まれた中央領域に存在する。赤い領域は中胚葉、青い領域は外胚葉を示す。(B) アニマルキャップ解離細胞を用いた脊索誘導の系。胞胚期の動物極側に存在するアニマルキャップ領域を 1 ng/ml 濃度のアクチビンで処理しても脊索だけの誘導は生じないが、カルシウムイオンとマグネシウムイオンが存在しない状況下で細胞を解離してから同濃度のアクチビンで処理すると脊索だけが誘導される。(C) 脊索が持つ強い集合能力を世界で初めて示した実験。左は実験の系を示す。脊索になる細胞を赤い蛍光色素で標識し、それ以外の細胞は緑で標識してから混ぜ合わしている。右は集合した脊索細胞の様子を示す。培養を始めて 10 時間後には予定脊索細胞 (赤色領域) は集合体の中央に集まるようになる。写真は Kuroda *et al.*, 1999 より抜粋。

が分かった（図 2C の右側 , Kuroda *et al*., 1999）。つまり、他の細胞群と比べて圧倒的に強い細胞接着性を脊索になる細胞群は有していることが分かったのである。

それでは、脊索を集合させる分子は何なのであろうか。予定脊索細胞がカルシウムイオンやマグネシウムイオンの不在時にバラバラに解離すること、そして、細胞同士が強い接着性を有することから、我々はカドヘリンファミリー（reviewed in Takeichi, 1995）に属する分子がその役割を担っていることを考え、カドヘリンファミリーに対象を絞った遺伝子スクリーニングを行った。その結果、脊索特異的に発現する分子 axial protocadherin（AXPC）を得ることができた（図 3B の左側と真中）。このプロトカドヘリンは一般的なカドヘリンファミリーに属する分子と違い、細胞外の繰り返しドメインが 6 つあり（一般的なカドヘリンは 4 つ）、また細胞内に β カテニンの結合領域を有していなかった（図 3A, Kuroda *et al*., 2002）。gain-of-functional な機能解析（本来その機能を有していない細胞群に人為的に追加機能を与えた状態を観察する解析）を行った結果、AXPC を発現させた外胚葉細胞は、脊索と同様の挙動を示し、強い集合能力を有することが分かった（図 3B の右側）。また、loss-of-functional な機能解析（目的の分子を元々発現している細胞から人為的にその機能を働かなくさせた状態を観察する解析）を行った結果、AXPC が働くことのできない脊索は、集合能力が欠失されることが分かった。驚くべきことに、AXPC が働かなくなった胚では脊索予定領域がポッカリと無くなり（図 3C）、脊索細胞の分散によって生じた異所的な神経構造の存在が確認された。以上の結果より、予定脊索細胞を脊索という組織にならしめていたものは AXPC であったことがわかる。

脊椎動物における AXPC の存在意義は極めて大きい。なぜなら、AXPC の存在なくして脊椎動物は、その形に至るスタートを切ることも許されない訳である。AXPC はヒトをはじめ他の全ての脊椎動物においても発見され、protocadherin-1 という名称でも呼ばれている（reviewed in Kahr *et al*., 2013）。面白いことに、同じ脊索動物門の生物であっても、尾索動物亜門（ホヤやサルパなど）や頭索動物亜門（ナメクジウオなど）には AXPC は存在しない（図 1 の系統樹を参照）。無論、脊索動物門以外も然りである。AXPC は

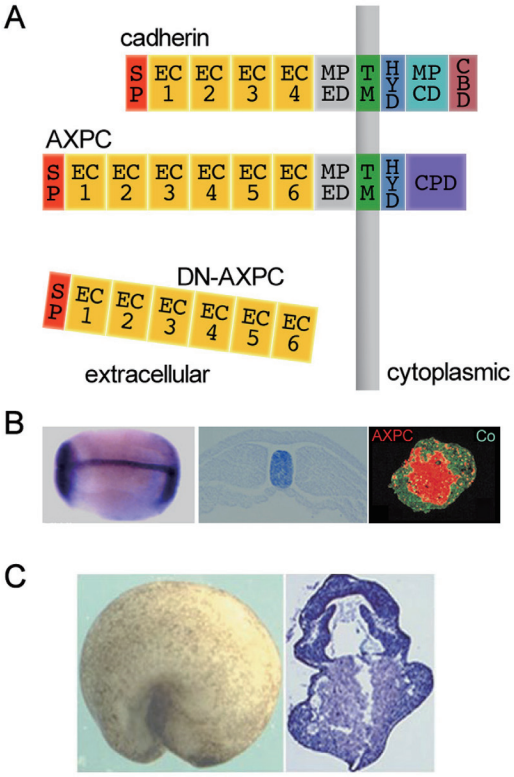

図３　AXPC は脊索に発現する脊索特異的な接着性を導く細胞接着分子である

（A）AXPC の構造。通常のカドヘリン（上段）は細胞外に繰り返し領域を 4 つ有すが、AXPC（中段）には 6 つ存在する。通常のカドヘリンに存在するカテニン結合領域（CBD）は AXPC には存在しない。下段は AXPC の働きを阻害するために人為的に作成した阻害フォーム（DN は dominant negative の略）。SP, signal peptide; EC, extracellular; MPED, membrane-proximal extracellular domain; TM, transmembrane; HYD, hydrophilic domain; MPCD, membrane-proximal conserved domain; CBD, catenin-binding domain; CPD, cytoplasmic domain.（B）AXPC の発現領域と AXPC を発現する AC 細胞が持つ強い接着性。左はステージ 18 の胚に対して、AXPC のプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーション解析を行った結果。真中はその切片。AXPC が脊索特異的に発現していることがわかる。左は、AXPC を発現させた AC 細胞（赤）とコントロールの AC 細胞を混ぜ合わせて培養した集合体。AXPC を発現する細胞が中央に集合していることがわかる。（C）DN-AXPC を顕微注入した胚。左は注入胚の外観。右はその切片。本来脊索が存在するはずの領域に大きな空間が生じ、神経管も存在していない。B と C の図は Kuroda *et al*., 2002 より抜粋。

脊椎動物特異的に存在する分子なのだ。我々が発見した AXPC 以外に脊椎動物にのみ特異的に発現する分子は報告されていないと思われる。脊椎動物を脊椎動物ならしめる分子として、AXPC 以上の意義を持つものはおそらく存在しないだろう。2015 年の 2 月の時点で、最も古い脊椎動物と認識されているのが古生代のカンブリア紀に棲息していたとされるメタスプリジーナ (*Metaspriggina*)、ハイコウイクティス (*Haikouichthys*)、そしてミロクンミンギア (*Myllokunmingia*) である (Holland and Chen, 2001; Xian-guang *et al*., 2002; Morris and Caron, 2014, 図 1 の左下に想像図を紹介する)。約 5 億 2 千万年前、彼らが初期発生の段階で AXPC を用いていたか否かを調べる術はないが、脊椎動物の特性として考えられている以上、そうであったかもしれない。AXPC の誕生が脊椎動物を出現させた可能性もあろう。

3　脊索の元となるオーガナイザーができる仕組み

3.1　脊索はオーガナイザーに由来する

1923 年、ドイツの科学者であるハンス・シュペーマン教授とヒルデ・マンゴールド研究員は、両生類であるイモリの胚を用いて、特定の領域を切り取り、別の領域に貼り付けるという実験 (交換移植実験) を集中的に行っていた。ある時、マンゴールド研究員が原腸胚期の背側に現れる原口 (将来の肛門になる陥入口) の上側の領域にあたる原口背唇部を切り取り、別の原腸胚の正反対の領域 (腹側領域) に移植して幼生になるまで培養するという実験を行った。その結果、移植された領域には本来の頭部や軸構造とは別に、追加の頭部ならびに軸構造 (二次軸) が形成された (Spemann and Mangold, 2001, 1924 年に独語雑誌に掲載されたものの英語翻訳版)。この事実は繰り返された検証実験でも確認され、両生類胚の原口背唇部が非常に強い誘導能を持つ領域であることが確実視されるようになった。これはオーガナイザー (日本語で形成体とも呼ぶ) として、広く世に知られることになり、この偉大な発見によりシュペーマンは 1935 年にノーベル医学生理学賞を受賞している。尚、マンゴールドは論文を発表した同年 9 月に自宅で生じたガス爆発で急逝し (享年 25)、ノーベル賞を得ることはなかった。彼女の一人息子のクリスティアンも第二次世界大戦で戦死することになる。

図 4 では、本研究室においてアフリカツメガエル胚を用いて行った同じ実験結果を示した。この実験では、図 4A で示すように青色で染色できる物質を注入した胚から、原口背唇部領域を切り取り、別の青色色素を注入していないツメガエル胚の腹側領域に移植している。その結果、やはりツメガエル胚においても見事に頭部構造を含む二次軸が誘導されていることが分かった（図 4B）。この二次軸を持つ胚を切片にして、詳細に内部構造を観察すると、脊索領域の全てが青色に染まっていることが分かる（図 4C-E）。将来、脊索になる細胞は全てオーガナイザー由来なのだ。それ故、脊椎動物のボディプランを理解する上で、オーガナイザー領域がどのように形成されるのかを示すことが、次なる課題になると言える。

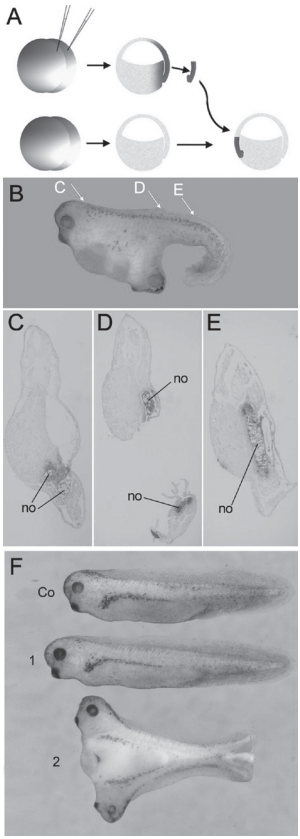

図 4　脊索は全てオーガナイザーに由来しているがオーガナイザーがなくても脊索を含む胚ができる矛盾

（A）二次軸内でのオーガナイザー由来領域を確認するための運命追跡実験系。青色色素 (biotin-dextran amine) を注入して標識した胚から原口背唇部領域を切り取り、別の原腸胚の腹側領域に移植した。（B）オーソドックスなオーガナイザー移植によって生じた二次軸胚。C、D、そして E の部位にて切片を作成した。（C-E）B において作成した切片。脊索が全てオーガナイザーに由来していることがわかる。no, notochord（脊索）。（F）オーガナイザー領域を取り除いた胚を培養したもの。Co はコントロール胚。1 はオーガナイザー領域を切り取り、そのまま培養を続けたもの。コントロール胚と殆ど違いなく正常発生した。2 は 1 から切り取ったオーガナイザー領域を用いて A に示す手法で二次軸を誘導した胚。A-E の図は Oelgeschläger *et al*., 2003 より抜粋。

3.2　体全体を誘導するオーガナイザーも背側化シグナルと中胚葉誘導によって誘導される

オーガナイザーが存在しなければ、胚はどのようなものになるのだろうか。これを示すための実験は簡単に思いつく。オーガナイザー領域を切り取り、そのまま胚を培養してやれば良いのだ。頭部や体軸構造を誘導する領域が存在しないのだから、当然、頭部や軸構造が失われた、まともな形態とは程遠い物体になることが予想される。実際はどうなのだろうか。本研究室では既にその実験を行っている。しかし、結果はその予想と遠くかけ離れたものになる。二次軸を誘導するために必要なオーガナイザー領域を切り取ったとしても、依然として頭部構造から体軸構造を含む胚が誘導されることが頻発するのだ（図 4F の 1 の胚）。頭部構造を失うものも確かに多く現れてくるが、少なくとも体軸構造を失う胚は現れず、全てのオーガナイザー欠損胚で体軸構造は維持される。つまり、オーガナイザーがなかったとしても、その胚の中で頭部構造と体軸構造が依然としてオーガナイズされているのだ。なぜ、このようなことが生じるのか。それは偏に、オーガナイザー領域も誘導されてできる領域であることに尽きる。つまり、原口背唇部として認識されている領域が切り取られたとしても、周辺に残っている細胞群の相互作用によって、直ちにそれに代わるオーガナイザー領域が形づくられるのだ。量的・時間的にそれが本来の発生の予定プランに間に合えば、オーガナイザー欠損胚でも正常な胚発生が生じることになる。オーガナイザーは発生の「司令塔」とも称されるが、サッカーの世界でも中盤の攻撃的ポジション辺りに位置する選手をそう呼ぶことが多い。チームの攻撃スタイルが定まっていれば、本来の司令塔の選手が出場できない時には残った選手から司令塔が代替される。それと似ているとも言えるだろう。つまり、オーガナイザーが存在しない状態を正確に知りたいとすれば、代替される仕組みをも断ち切った状態を胚内に創り出すしかない。オーガナイザーをオーガナイズする、もっと根本的な機構をブロックすることが求められる。

オーガナイザー形成に必要不可欠な背景が二つある。第一に挙げられるのが、背側化シグナルである（図 5A）。これは細胞質基質に存在する β カテニンというタンパク質が、背側化領域において核内に移行することによって生じ

る (Heasman *et al*., 1994)。核内に移行したβカテニンは背側化に必要な代表的遺伝子であるシャモア (*Siamois*) やトゥウィン (*Twin*) などの転写に必要不可欠である (Lemaire *et al*., 1995; Wylie *et al*., 1996; Laurent *et al*., 1997)。具体的にはシャモアやトゥウィンの転写を阻害する物質であるグルーチョ (Groucho) などを DNA 上から取り除き、その結果シャモアやトゥウィンなどが発現することによって背側化シグナルがオンとなる (Roose *et al*., 1998)。この背側化シグナルを阻害する方法はいくつかあるが、例えばβカテニンというタンパク質自体の合成を阻害したものでは、オーガナイザーは形成されず、胚は超腹側胚と呼ばれる正常胚とは似ても似つかぬ形態となる (Heasman *et al*., 2000)。第二に挙げられるのが、中胚葉誘導である。図 5B にはその代表的な分子シグナルであるノーダル (nodal) をリガンドとした Smad2 シグナルを示した。脊椎動物の初期胚に元々存在する領域は外胚葉と内胚葉のみであり、中胚葉は内胚葉から分泌された中胚葉誘導物質ノーダルが外胚葉に働きかけ、その誘導を受けた外胚葉部分が中胚葉化するのだ (Jones *et al*., 1995; Takahashi *et al*., 2000)。オーガナイザーは背側中胚葉とも呼ばれる中胚葉の一部であり、ノーダルが働かない胚ではオーガナイザー形成は完全に阻害される (Piccolo *et al*., 1999; Wessely *et al*., 2001)。もちろん、βカテニンの合成を阻害した時と同様に正常胚とは全く異なる形態となる。つまり、オーガナイザー自体が重要と言うよりはむしろ、オーガナイザーが造られる機構自体が重要なのだ。

3.3　ニューコープセンターの働きを受けた BCNE センターがオーガナイザーになる

シュペーマンとマンゴールドによって発見されたオーガナイザーこそが脊椎動物の体全体の誘導に必要不可欠であるという考え方は 1923 年の彼らの発見以来 (Spemann and Mangold, 2001, 1924 年に独語雑誌に掲載されたものの英語翻訳版)、20 世紀末まで、実にほぼ 3 四半世紀もの間、発生学の世界に圧倒的な存在感で君臨することになる。20 世紀末とは分子生物学が発展し、特定の遺伝子のセントラルドグマ (DNA が転写されて RNA となり、RNA が翻訳されてタンパク質になるという過程) を様々な手法によって人為的に操れる手法が発生学にも浸透した時代だ。当然、オーガナイザーが形成される

時期に発現する遺伝子はグースコイド（goosecoid）の発見を皮切りに次々と見つかっていく（Cho *et al*., 1991）。グースコイドは細胞内で働くホメオボックスタンパク型転写因子であるが、周りの細胞群に影響を及ぼすためには細胞外で働く分泌タンパク質に注目する必要性があり、それらも次々と発見されていく。図5Cには、背側のオーガナイザー領域はもちろん腹側領域にも特異的に発現する分泌型タンパク質を示した（De Robertis and Kuroda, 2004）。この中でもコーディン（chordin）とノギン（noggin）がオーガナイザー形成の鍵となる。

我々の研究グループは、コーディンとノギンの両者がオーガナイザーの現れる原腸胚初期（ツメガエル胚では常温において受精9時間後）の遥か前にあたる胞胚期（受精7時間後）の段階において、既に将来のオーガナイザーになる領域において発現していることを発見している（Kuroda *et al*., 2004）。また、この発現は中胚葉誘導物質であるノーダルの働きを阻害した場合にも全く影響を受けないことも確認している（Ishibashi *et al*., 2008）。我々はこの領域を「胞胚期にコーディンとノギンが発現するセンター」としてBCNE（blastula chordin- and noggin-expressing）センターと名づけた（Kuroda *et al*., 2004）。これとは別に、胞胚期の内胚葉領域にはノーダルを大量に発現する領域であるニューコープセンターが存在する（Nieuwkoop, 1973, 図5D）。実はBCNEセンターもニューコープセンターも上述したβカテニンに依存した背側化シグナルによって誘導されるのであるが、ニューコープセンターは内胚葉領域に発現しているT-box型転写因子であるVegTが共存する背景によって、逆にBCNEセンターはVegTが共存しないことによって決定づけられる（Ishibashi *et al*., 2008）。BCNEセンターは、そのまま培養すると脳などの前方神経系の組織に分離するが（実際、ツメガエル胚において前脳や中脳はBCNEセンターに由来する）、ニューコープセンターから分泌されるノーダルの刺激を受けると、オーガナイザーになるのだ。背側化シグナルと中胚葉誘導のいずれかひとつの背景を阻害するだけで、脊椎動物の胚発生は完全に働かなくなる理由は、その相互作用によってオーガナイザー領域が形成されるからに他ならない。

本研究室では、胞胚期の動物極側の未分化細胞群であるアニマルキャップ

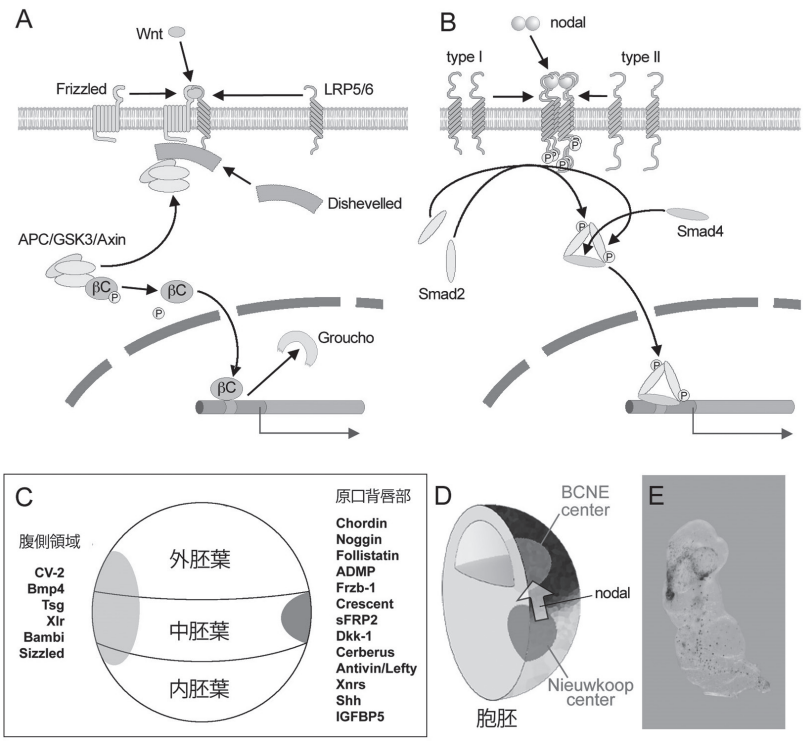

図５　背側化シグナルと中胚葉誘導の組み合わせがオーガナイザー形成の大前提となる

（A）背側化シグナル。別名カノニカル・ウィント（Wnt）シグナルとも呼ばれる。リガンドである Wnt が受容体である Frizzled と LRP5/6 に結合すると、受容体の細胞内ドメインに Dishavelled が結合し、APC/GSK3/Axin 複合体を呼び寄せる。この時、普段、この複合体に捕捉されて GSK3 によってリン酸化（それが引き金となって消化）されているβカテニン（bC）は遊離し、核内に移行する。核移行したβカテニンは標的遺伝子の転写を抑えていた Groucho をプロモーター領域より取り除き、背側化シグナル関連遺伝子の転写が起こる。（B）中胚葉誘導の代表的シグナルである Smad2 シグナル。リガンドである nodal は type I と II の複合受容体に結合し、受容体の細胞内領域がリン酸化される。この時、細胞質中の Smad2 分子の C 末端がリン酸化され、Smad4 と共にヘテロ三量体が形成される。三量体は核内に移行し、標的遺伝子の転写を促進する。（C）原腸胚に発現する分泌タンパク質。原口背唇部もしくは腹側特異的に発現する分子のうち代表的なものだけをリストアップしている。（D）胞胚期に現れる 2 つのセンター。Nieuwkoop センターから分泌された nodal が BCNE センターに働きかけ、誘導を受けた BCNE センター領域がオーガナイザーになると考えられる。（E）人工的に誘導した BCNE センターと Nieuwkoop センターを利用して、アニマルキャップ（AC）細胞のみから作成した疑似胚様構造。脊索、筋肉、神経などが確認され、刺激に応じて反応して運動する。映像は次の URL にて確認できる。http://youtu.be/HJ4DM0TlGb0

(AC) 細胞から、人為的に BCNE センターとニューコープセンターを創り出すことに成功している (Ishibashi *et al*., 2008)。AC 細胞は、哺乳類胚における ES (embryonic stem) 細胞と同義の領域であり、やはり人為的に誘導された未分化細胞である iPS 細胞と同様の性質を持っている。この二つのセンターが組み合わされば、AC 細胞のみでオーガナイザーは創られることになり、脊索も形成され、脊椎動物の体全体の構造を創り出す土台として利用することができるのではないだろうか。これは現在、研究途上の内容であるが、既に外界からの物理的刺激に応じて動く幼生様の全体構造ができることが確認されている (図 5E, URL: http://youtu.be/HJ4DM0TlGb0)。次項にて、iPS 細胞から心臓が形成される機構について説明するが、将来的に、iPS 細胞から、BCNE センターとニューコープセンターを創り出すことによって、生命の全体構造を一気に創り出す時代も到来するかもしれない。

4　iPS 細胞を用いた心臓再生医療と繊維芽細胞

4.1　iPS 細胞

卵から成体へ変化していく経過において、各段階から適当な細胞を選択したとすれば、時間軸に従って細胞が持つ可能性というものは減少していくことになる。受精直後の卵は全ての組織になることができる。これは分化全能性 (totipotency) と呼ばれる。赤血球や白血球やリンパ球などは骨髄に存在する骨髄幹細胞が元になる。骨髄幹細胞が持つ性質は分化多能性 (multipotency) と言える。赤血球になると、もはや他の種類の細胞にはなれない。赤血球は分化単能性 (unipotency) の段階であるからだ。アフリカツメガエル (図 1 の両生綱にイラストを示す) の胞胚期に存在する AC 細胞について上述したが、この細胞群は分化万能性 (pluripotency) を持つと言える。哺乳類において、同じく分化全能性を持つ細胞が胚盤胞 (胞胚期) 内側の内部細胞塊に存在する ES 細胞である。この細胞は細胞の位置を変えたとしても何の影響もなく発生が行われる。それ故、様々な分化誘導の対象として用いられる他、特定の遺伝子を壊した状態の ES 細胞を混ぜることによって、遺伝子ノックアウトマウスの作成などにも用いられる。

脊椎動物において、既に分化単能性を有す状態までに分化した細胞が AC

細胞や ES 細胞と同じ分化万能性を有する状態に戻すことができるか否か。この問いは、体細胞を元にクローン生物が作れたという事実によって、1958 年の段階で答えが出されている。英国の科学者であるジョン・ガードン博士はアフリカツメガエルの幼生の小腸の上皮細胞から取り出した核を用い、紫外線照射によって核の働きを失った受精卵の中に移植することによって、体細胞クローンが作れることを証明した（Gurdon *et al*., 1958）。この発見は、永い年月をかけて、iPS 細胞の発見を導くことになる。2006 年、山中伸弥博士らの研究グループは哺乳類の分化した細胞であっても、*Oct3/4*、*Sox2*、*c-Myc*、そして *Klf4* の 4 つの遺伝子（山中ファクター）を活性化させることによって、ES 細胞とほぼ同様の分化段階になることを証明した（Takahashi and Yamanaka, 2006）。ガードン博士と山中博士はそれらの功績として 2012 年にノーベル医学生理学賞を受賞している。

4.2　iPS 細胞を用いた心臓組織の形成

近年、重症心不全を始めとする心臓の致命的な疾患や損傷に対しては、心臓移植が有効とされ実施されてきている。このような背景の元、多くの患者が臓器移植を希望しているが、臓器提供者の数は依然として少数のままであり、一部の患者にのみ適用可能な現状がある（OPTN; Annual Report 2013; Transplant Activity Report 2009; Milliman Research Report 2008）。

そこで注目をあびているのが再生医療である。細胞ソースとして ES 細胞や iPS 細胞を始めとする幹細胞を選択することで、出生後に自己増殖能を失う心筋細胞を作成できることは既に明らかとなっており、臨床応用に向けた心筋細胞への効率的な分化誘導方法（Zwi *et al*., 2009）、増殖方法（Shimoji *et al*., 2010）、純化・精製方法（Uosaki *et al*., 2011）についても実験手法はほぼ確立されている。特に iPS 細胞は体細胞に複数の因子を導入するだけで多能性を有する幹細胞を作成（リプログラミング）が可能であり、ES 細胞のように受精卵を用いないため倫理上の問題が少なく、再現性が高く、初期化が簡便であることから、再生医療実現のための細胞ソースとして有力視されている（Takahashi *et al*., 2006）。これを受け、現在までに数多くのリプログラミング方法が報告されており、がん原因遺伝子である c-Myc を除く山中ファ

クターを導入する手法（Nakagawa *et al*., 2008）や、レトロウィルスベクター以外のベクターを用いる手法（Carey *et al*., 2009; Zhang *et al*., 2011; Yu *et al*., 2009; Narsinh *et al*., 2011; Okita *et al*., 2008; Fusaki *et al*., 2009）、組み換えタンパク（Zhou *et al*., 2009; Kim *et al*., 2009）や mRNA（Warren *et al*., 2010）、miRNA（Miyoshi *et al*., 2011）を用いてリプログラミングを行う手法など、臨床グレードに適う iPS 細胞の作成方法が日夜開発されている。

しかし、いかに iPS 細胞が優れていても、最適な移植療法が提案されない限り患者への適用はほど遠い。iPS 細胞由来の分化誘導心筋細胞を心筋梗塞部位に注射器を用いて移植しても、移植部位の血流によりほぼ生着せず、治療効果が見られないことが明らかとなっている。そこで再生医療では組織工学的アプローチによる移植療法が提案され、生体外（in vitro）で三次元組織を構築し、疾患部に移植する手法が実施されている。中でも、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミド（PIPAAm）を器材表面にナノメートルオーダーで固定化した温度応答性培養皿を用いて作成したプライマリー心臓組織（心筋細胞シート）は均一の拍動能を呈し、機能的で厚い組織であることが報告されている（Shimizu *et al*., 2002; Shimizu *et al*., 2003）。これは PIPAAm の相転移温度が 32° C であり、器材表面が 32° C 以下の温度に達すると、器材表面のポリマー鎖が水分子と水和し親水性を示すことから、器材上で培養した生細胞を酵素を用いることなく、細胞へのダメージを最小に、シート状の組織として回収できる性質を有するためである（図 6, Kikuchi *et al*., 1998; Okano *et al*., 1995）。この温度応答性培養皿を用いた多能性幹細胞（ES 細胞、iPS 細胞）由来の心臓組織の作成方法も報告されているが、心臓線維芽細胞との共培養が必要不可欠であり、幹細胞由来心筋細胞単独では組織を作成できないことが明らかとなっている（Matsuura *et al*., 2011; 岩宮 , 2014）。従って、iPS 細胞を用いた機能的な心臓組織の作成においては、適切な細胞間ネットワークや細胞外マトリックスの作成が重要であることが示唆される。

心臓線維芽細胞を始めとする線維芽細胞は形態学的に分類された細胞であるが、その局在する部位や病態において発現遺伝子を大きく異なることが報告されている（Chang *et al*., 2002）。心臓部の心臓線維芽細胞ただ 1 種類でさえ、その発生経路が多岐に渡り、その機能も細胞外マトリックスの恒常性の維持、

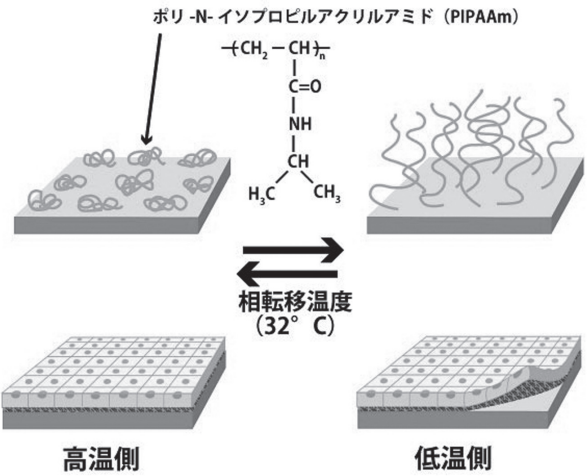

図６　温度応答性培養皿によるシート状組織（細胞シート）の回収方法

ポリ-N- イソプロピルアクリルアミド（PIPAAm）を器材表面にナノメートルオーダーで固定化した温度応答性培養皿は、器材表面の相転移温度が 32°C であり、32°C 以下では器材表面のポリマー鎖が水分子と水和し親水性を示す。逆に、32°C 以上では疎水性を示す性質を有する。この機能により、器材上で培養した生細胞は酵素を用いることなくシート状の組織として回収できる。

生理活性物質の産生、心臓の血管系の維持、心臓の電気生理への貢献など、心臓部の微小環境の変化を感知して機能を保持すべく多彩かつユニークな機能を兼ね備え、心臓組織の構築においても重要な役割を果たすことが示唆されている（図 7, Berk *et al*., 2007; Guido *et al*., 2010; Winter *et al*., 2007; 岡亨 , 2011）。既に、心筋再生治療を目的としたヒト iPS 細胞由来心筋シートの臨床研究も開始されているが、組織を形成するための「つなぎ」として、心臓線維芽細胞の回収方法が確立されていない事から、その代替として皮膚線維芽細胞や間葉系幹細胞を用いている現状がある（Kawamura *et al*., 2013）。

従って今後、臨床応用を目指した、より機能的な iPS 細胞由来心筋組織を作成するためには、安全性の高い iPS 細胞の作成だけでなく、心臓線維芽細胞の回収方法を確立し、適切な細胞間ネットワークや細胞外マトリックスで構築された心臓組織の作成が必要不可欠であると考えられる。

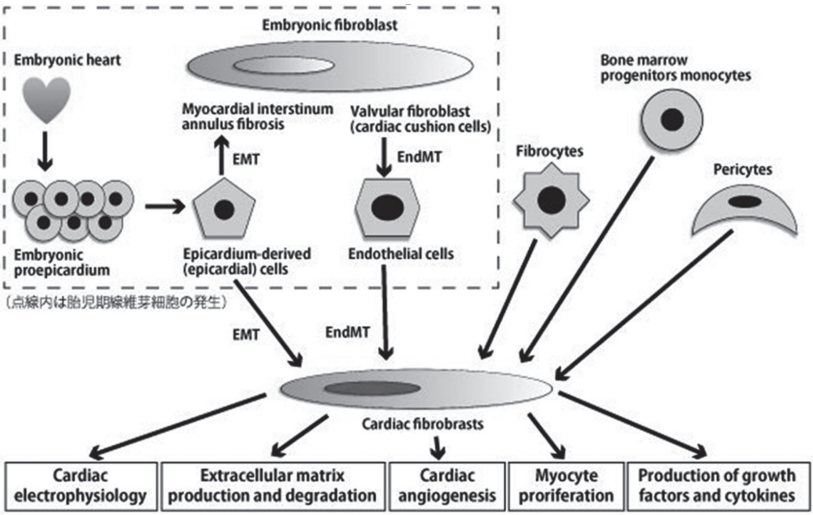

図 7　心臓繊維芽細胞の発生学とその機能 (岡亨 , 2011 より抜粋)

心臓線維芽細胞は、胎児期において心外膜由来細胞もしくは血管内皮細胞から EMT（上皮間葉転換）、EndMT（内皮間葉転換）を経て形成される。その他にも心臓部の各種の病態や障害に応じて、ファイブロサイト、骨髄系前駆細胞、ペリサイトからも動員される。発生経路が多岐に渡る心臓線維芽細胞の機能は細胞外マトリックスの恒常性の維持、生理活性物質の産生、心臓の血管系の維持、心臓の電気生理への貢献など、多彩かつユニークな機能を兼ね備えている。

5　結論

今回、脊椎動物の発生過程について、脊索の形成機構とその根源となる領域の形成について解説し、生命体の全体構造や移植可能なレベルの心臓を、分化万能性を有す細胞から人工的に構築できる可能性を示した。確かに、冒頭に述べたように身の周りの物質から赤ん坊を創り出す機械が登場することを想像した漫画も存在するが、一概に妄想の域と一笑に付せたものではない。少なくとも半世紀前の時点で、現在の発生学の発展を予想していた者は殆どいなかっであろうから。21 世紀となり急激な発展を遂げた発生学は、再生医学領域の中心的存在になりつつある。人工的に生物や臓器が造られる際に問題となるのが、安全、環境、そして倫理に関する側面であろう。アシロマ会議、カルタヘナ議定書、そして「ヒトに関するクローン技術等の規制に関する法律」

などに代表される国際理解や法規制なども確かに存在するが、発生学の発展速度は余りにも速く、それらの制限に縛られないものを次々と生み出していると言える。

参考文献

http://kerolab.jp/SFCJ/kuroda_iwamiya_morimoto_ref.pdf

De Robertis, E. M. and Kuroda, H., “Dorsal-ventral patterning and neural induction in Xenopus embryos.” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*., 20, 2004, p.285-308.

Ishibashi, H., Matsumura, N., Hanafusa, H., Matsumoto, K., De Robertis, E. M. and Kuroda, H., “Expression of Siamois and Twin in the blastula Chordin/Noggin signaling center is required for brain formation in Xenopus laevis embryos.” *Mech. Dev*., 125, 2008, p.58-66.

Kuroda, H., Inui, M., Sugimoto, K., Hayata, T. and Asashima, M., “Axial protocadherin is a mediator of prenotochord cell sorting in Xenopus.” *Dev. Biol*., 244, 2002, p.267-277.

Kuroda, H., Sakumoto, H., Kinoshita, K. and Asashima, M., “Changes in the adhesive properties of dissociated and reaggregated Xenopus laevis embryo cells.” *Dev. Growth Differ*., 41, 1999, p.283-291.

Kuroda, H., Wessely, O. and De Robertis, E.M., “Neural induction in Xenopus: requirement for ectodermal and endomesodermal signals via Chordin, Noggin, beta-Catenin, and Cerberus.” *PLoS Biol*., 2, 2004, p.623-634.

岩宮 貴紘 (2014)「心臓培養材料」特願 2014-142804.

〔受付日　2015. 2. 24〕