
総説

心臓前駆細胞特異的表面抗原 GFRA2

八代 健太*

京都府立医科大学大学院医学研究科生体機能形態科学

GFRA2, a Specific Surface Antigen for Cardiac Progenitor Cells in Humans and Mice

Kenta Yashiro

*Department of Anatomy and Developmental Biology,
Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medicine*

抄録

心臓を構成する細胞へと分化できる心臓前駆細胞（以下，CPCs）に特異的な表面抗原を用いれば，遺伝子改変操作を行わずにCPCsを同定し純化することができる。そのような分子は基礎生物学にも再生医療学的にも極めて有用であるが，残念ながらこれまで見出されていなかった。私たちは最近になって，グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）受容体ファミリーの一つであるGFRA2がCPCs特異的なGPIアンカー型の細胞表面抗原であり，これを用いることで，多分化能を有する未熟なCPCsと，少し分化が進んで心筋に分化の方向が固定された単分化CPCsを個別に単離できることを見出した。さらに，GFRA2は従来知られていなかった全く新しいシグナル経路を介することで，心臓の発生にも重要な役割を果たしていることが判明した。本稿では，学術誌へと報告したGFRA2を発現しているCPCsの特質と，この分子が心臓発生に果たす生理的機能，およびこの表面抗原の基礎研究および再生医療研究上の重要性について概説と議論を試みたい。

キーワード：GFRA2，心臓前駆細胞，表面抗原，心筋緻密化。

Abstract

A surface marker specific for cardiac progenitor cells (CPCs) is useful to robustly isolate them with circumventing the necessity of genetic modification. However, no such a specific marker had been available. Recently we have reported that a Glycosylphosphatidylinositol-anchor containing neurotrophic factor receptor Glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha 2 (*Gfra2*) is specifically expressed in CPCs of both mice and humans. This molecule allows to isolate purer CPCs in a good quality than ever as well as identifies two distinct stages of CPCs, (1) relatively immature multipotent CPCs and (2) CPCs committed only

令和元年5月31日受付 令和元年6月21日受理

*連絡先 八代健太 〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路ル梶井町465番地
kyashiro@koto.kpu-m.ac.jp
doi:10.32206/jkpum.128.07.471

to cardiomyocytes. More importantly, mouse *Gfra2* mutants revealed a crucial role of GFRA2 for ventricular compaction via an alternative and novel signal pathway. In this review, we overview and discuss the character of GFRA2⁺ CPCs, the role of GFRA2 in the heart development and the importance of this molecule in future development of regeneration/cell replacement therapies to treat the heart failure.

Key Words: GFRA2, Cardiac progenitor cells, Surface antigen, Non-compaction.

はじめに

心臓の発生と心臓を構成する細胞の分化過程を理解することは、先天性心疾患の病理病態の理解につながるだけではなく、昨今注目されている心臓に対する再生医療の研究開発にとっても極めて重要である。

心臓は脊椎動物の発生で最初に解剖学的に認識できる臓器である。心臓を構成する細胞の多くは、一部の神経堤由来の細胞を除き中胚葉に由来する(図1A)¹⁾²⁾。初期胚の後方に原始線条が形成され、そこで生じる原腸陥入によって多能性を有する原始外胚葉(または上胚盤葉/エププラスト)細胞から上皮間充織転換によって中胚葉細胞が生じる。中胚葉の細胞は胚の前方方向へと遊走移動するが、この中で心臓へ寄与する能力のある細胞が胚の前方でCPCsとしてのアイデンティティを確立し、三日月の形に分布するようになる(これをcardiac crescentと呼ぶ)。その後、CPCsは心筋と心内膜の細胞へ分化を遂げながら胚の正中線上で原始心円筒を形成し、右方向へループを形成し折りたたまれることで、将来の左右の心室と心房、および流出路(大動脈と肺動脈)と流入路(大静脈と肺静脈)の基本パターンが完成する。

上述のような心臓発生の基本的過程における分子生物学的機構に関し、この20年余の間に精力的に解析がなされてきたが、まだまだ多くが不明のままである。原腸陥入を起こして中胚葉が生じるには、WNT, NODAL(本質的にはACTIVINのシグナルにほぼ等しい)、そしてBMPのシグナルが適切な強度で時空間的に制御されていることが必要である¹⁾。心臓を構成する細胞へ分化する能力を有した中胚葉細胞がCPCs

としてのアイデンティティを確立するには、今度はWNTのシグナルとNODALシグナルが抑制されねばならない。次にCPCsが心筋へと最終分化を遂げる際にもWNTのシグナルが抑制されていることが必要である。現在、様々な形で用いられている多能性幹細胞(ES/iPS細胞)からの心筋分化誘導プロトコールは、概ねこのような知見をベースに組み立てられている。ここで注意したいのは、これらの知見は全て必要条件で、十分条件はいまだに明らかにされていないことだ。したがって、再生医療用にES/iPS細胞から心筋を得ようとした場合に、いくら高効率の心筋分化誘導を得られると謳われているプロトコールを用いようとも、心筋へ向かう方向へとできる限りのバイアスをかけているに過ぎない。分化を完全に制御することは不可能なので、何らかの純化する操作を追加しなければ純度の高い心筋を得ることも不可能であるし(必要のない細胞は必ずある程度混入している)、バッチごとに分化効率(すなわち収量)も当然一定しないので、再生医療用の細胞を安定して供給することも困難であるし、コストも高くつくことは容易に想像できる。

心臓を構成する細胞系譜を純化する目的でCPCs特異的な細胞表面抗原を用いることができれば、基礎研究においても再生医療においても大変に便利である。このような表面抗原を目印にすれば、生きた状態で簡便にセルソーターを用いてCPCsを純化でき、心筋などの心臓を構成する細胞が分化して行く様子を*in vitro*で観察することを容易にし、かつ、再生医療用に必要な細胞の純度も改善することができるはずである。しかしながら、CPCsに特異的に発現するそのような分子は今まで知られておらず、CPCsを同定

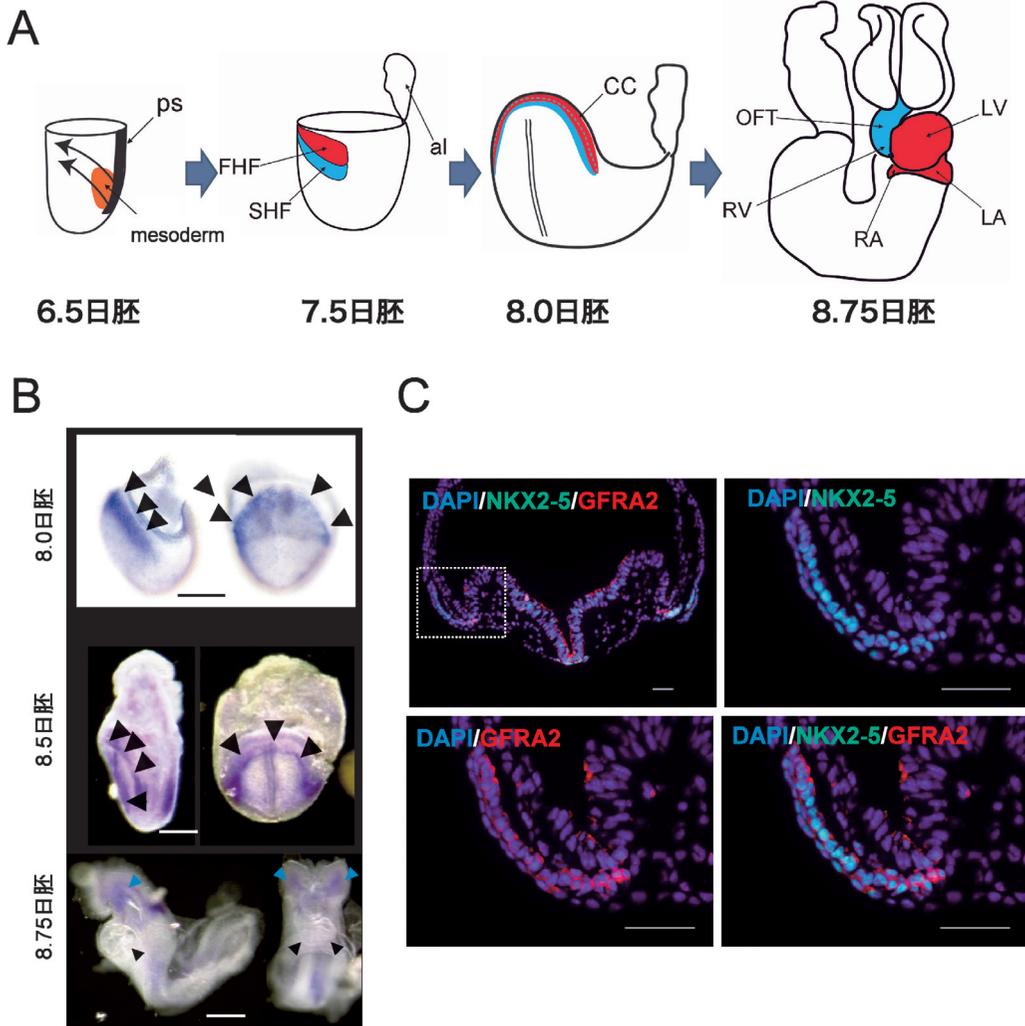


図1 CPCs特異的に発現する GPI アンカー型細胞表面抗原 *Gfra2*

- A. マウス胚における心臓発生の概要. マウス6.5日胚の後方で原腸陥入が生じ, 原始線条 (ps) 内で中胚葉 (mesoderm: オレンジ色) が産生され, 胚の前方方向へと遊走移動する. 胚の前方でCPCsとしてのアイデンティティを獲得し, 第1心臓領域 (FHF) CPCs (赤色) と第2心臓領域 (SHF) CPCs (青色) へと分化する. 8.0日胚になるとCPCsは三日月状に分布しているのので, cardiac crescentと呼ばれている. その後, CPCsは心筋と心内膜へと分化しながら胚の中央で原始心円筒を形成し, 右方向へとループ形成を行うことで, 将来の左心房 (LA), 左心室 (LV), 右心房 (RA), 右心室 (RV), 流出路 (OFT: 大動脈幹と肺動脈幹のこと) を形作る. 文献2より改変し引用.
- B. マウス初期胚における *Gfra2* の発現. *Gfra2* 遺伝子に対して, whole mount *in situ* hybridization を行なった. Cardiac crescentに *Gfra2* の mRNA が検出されている (黒矢頭). 8.75日胚で, 心円筒のループリングが完了し拍動が開始された頃には, 心臓での *Gfra2* の発現が消失し, 神経堤細胞での発現が開始している (青矢頭). Scale bar: 250 μ m.
- C. マウス7.5日胚における GFRA2 タンパクの局在. 8.0日胚の切片に対し蛍光抗体染色を行なった. GFRA2 (赤色) が NKX2-5 (緑色) が陽性の細胞に局在していることに注意. DAPI (青色) にて核染色を施してある. Scale bar: 50 μ m. BおよびCは, 文献8より改変し引用 (CC by 4.0).

するためのいくつかの非特異的なマーカー分子の組み合わせが提唱されてきた^{3,7)}。これらの手法は基礎研究の場では一定の成果を挙げてきたものの、いずれの抗原も非特異的なものであるために、いったいどの程度純化された細胞を私たちが手にしているのかを検証しようがない問題があった。

私たちは、先行研究として、マウス胚のCPCsの持つ特質を解析するためにシングルセル遺伝子発現解析を行った。このデータをもとに、CPCs特異的な細胞表面抗原を見いだすための研究を企画し、遂行することにした。

CPCs 特異的細胞表面抗原のスクリーニング

まず、私たちは先行して行ったマウス7.5日胚のCPCsに対するシングルセル遺伝子発現解析データをもとに、マウスES細胞の遺伝子発現データと比較することで、CPCs特異的に発現していると思われる細胞表面抗原の候補をリストアップした⁸⁾。その候補分子に対し、マウス胚を用いて組織学的な検証を行った結果、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 受容体ファミリーの一つであり、GPIアンカー型の細胞表面抗原でもある *Gfra2* 遺伝子が、cardiac crescent に特異的に発現していることを見出した (図1B)。このCPCsにおけるmRNAの発現は一過性で、原始心円筒が形成され拍動が始まると *Gfra2* の心臓での発現は消失していた。

次にマウス7.5日胚内でのcardiac crescentにおけるGFRA2タンパクの分布を、特異的な抗体を用いて検証した (図1C)。CPCs特異的な転写因子であるNKX2-5に対する抗体を用いてCPCsをラベルした上でGFRA2タンパクの分布を調べたところ、NKX2-5陽性の細胞とGFRA2陽性細胞は完全に一致することが判明した。これらの事実より、マウス *Gfra2* はCPCsに特異的に発現をしている細胞表面抗原であると結論付けた。

GFRA2⁺ CPCs の特質

次に *Gfra2* を発現しているCPCsの特質を、ES/iPS細胞を用いて検証した⁸⁾。ヒトのES/iPS

細胞に対して心筋への分化を誘導し、継時的に *GFRA2* と *NKX2-5*、そして心筋のマーカー遺伝子 *MYL2* (*MLC2v*) の発現をリアルタイムRT-PCRにて検証した (図2A)。その結果、*GFRA2* は、*NKX2-5* の発現が立ち上がってくる少し前から発現し始め、分化誘導開始後7~8日目に発現強度がピークになり、その後漸減した。*GFRA2* の発現が減少して行くに従って、心筋は最終分化 (*MYL2* の発現と拍動の開始) を遂げていた。

次に、*GFRA2* の発現強度がピークに達している分化誘導8日目の細胞を、汎中胚葉マーカーであるPDGFRAも用いて、*GFRA2*⁺/*PDGFRA*⁺細胞としてセルソーターにより単離した (図2B)。*GFRA2*⁺/*PDGFRA*⁺細胞は、分化誘導をかけた全細胞中の9~10%程度を占めていた。さらに単離した細胞に対して分化培養を継続したところ、*GFRA2*⁺/*PDGFRA*⁺細胞からは、ほぼ心筋しか分化してこなかった (図2B, C)。従来、CPCsは心筋・平滑筋・内皮へと分化できる多分化能を有した細胞であると考えられていたため¹⁾⁹⁾、この結果には驚かされた。

一方で、ヒトES細胞に分化誘導をかけた3~4日目の細胞から、先の*PDGFRA*に血管内皮増殖因子VEGFの受容体であるKDRを組み合わせて *KDR*^{low}⁺/*PDGFRA*⁺として得られる細胞集団は、心筋・平滑筋・内皮へと分化できる多分化能を有するCPCsであることが提唱されていた⁶⁾。そこで、この *KDR*^{low}⁺/*PDGFRA*⁺である細胞集団が *GFRA2* 陽性であるかどうかを検討することにした (図3A)。その結果、これも驚くべきことに、*KDR*^{low}⁺/*PDGFRA*⁺細胞の全てが *GFRA2* を発現しているわけではなく、せいぜいその30~40%ほどが *GFRA2* を発現しているに過ぎないことが明らかとなった。そこで、*GFRA2*⁺/*KDR*^{low}⁺/*PDGFRA*⁺細胞と *GFRA2*^{neg}/*KDR*^{low}⁺/*PDGFRA*⁺細胞の性質の違いを検証するため、セルソーターでこれらの細胞集団を個別に単離後、それぞれ分化培養を継続したところ、*GFRA2*⁺/*KDR*^{low}⁺/*PDGFRA*⁺細胞は80%ほどが心筋や平滑筋などの心臓の細胞へと分化したのに対し、*GFRA2*^{neg}/*KDR*^{low}⁺/*PDGFRA*⁺細胞はほとんどが

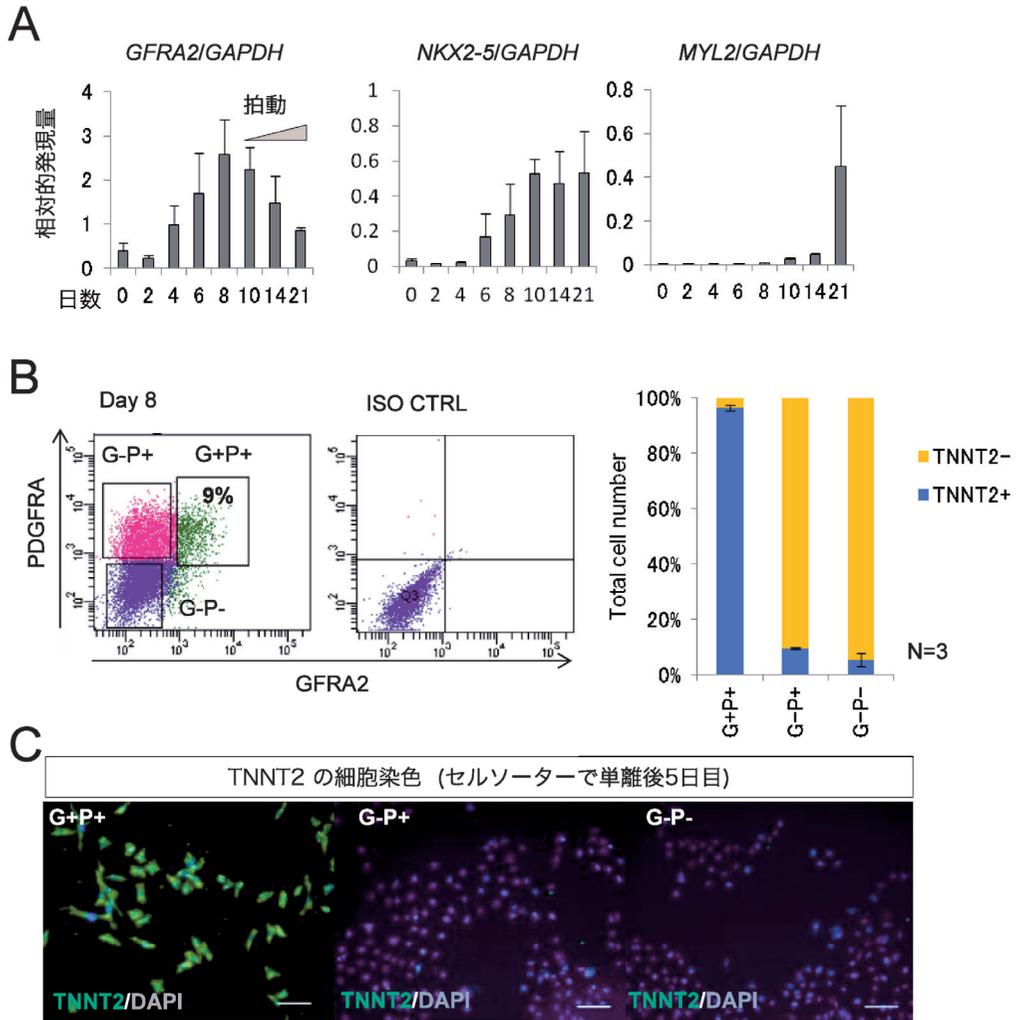


図2 GFRA2⁺/PDGFRA⁺ CPCs の特質

- A. ヒト ES 細胞の心筋分化過程における *GFRA2* 遺伝子の発現パターン. ヒト ES 細胞へ心筋へと分化誘導をかけ, 表記した日付ごとに細胞を回収し, *GFRA2*, *NKX2-5* (CPCs マーカー), *MYL2* (*MLC2v*: 心筋の最終分化マーカー) に対して real time RT-PCR を行なった. *GFRA2* の発現は *NKX2-5* よりもやや早くに発現が開始し, *NKX2-5* の発現がピークになる前に発現がピークに達してその後漸減する. *GFRA2* の発現が低下していくに従って心筋の最終分化を遂げて, 拍動が開始する.
- B. 心筋にのみ分化する GFRA2⁺/PDGFRA⁺ CPCs. セルソーターを用い, GFRA2⁺/PDGFRA⁺ CPCs (G + P+) を回収し, 分化培養を継続したところ, ほぼ全ての細胞が心筋に分化した. GFRA2 陰性の細胞 (G - P+ または G - P-) は心筋には分化できなかった.
- C. GFRA2 陽性細胞の分化. B の実験においてセルソーターで細胞を回収後, 5 日間分化培養を行い, 蛍光抗体染色をおこなった. GFRA2 陰性細胞からは, TNNT2 (cardiac troponin T: 心筋の最終分化マーカー) 陽性の心筋が認められないことに注意. Scale bar: 100 μm. 青色: 角 (DAPI).
- 図は, 全て文献 8 より改変し引用 (CC by 4.0).

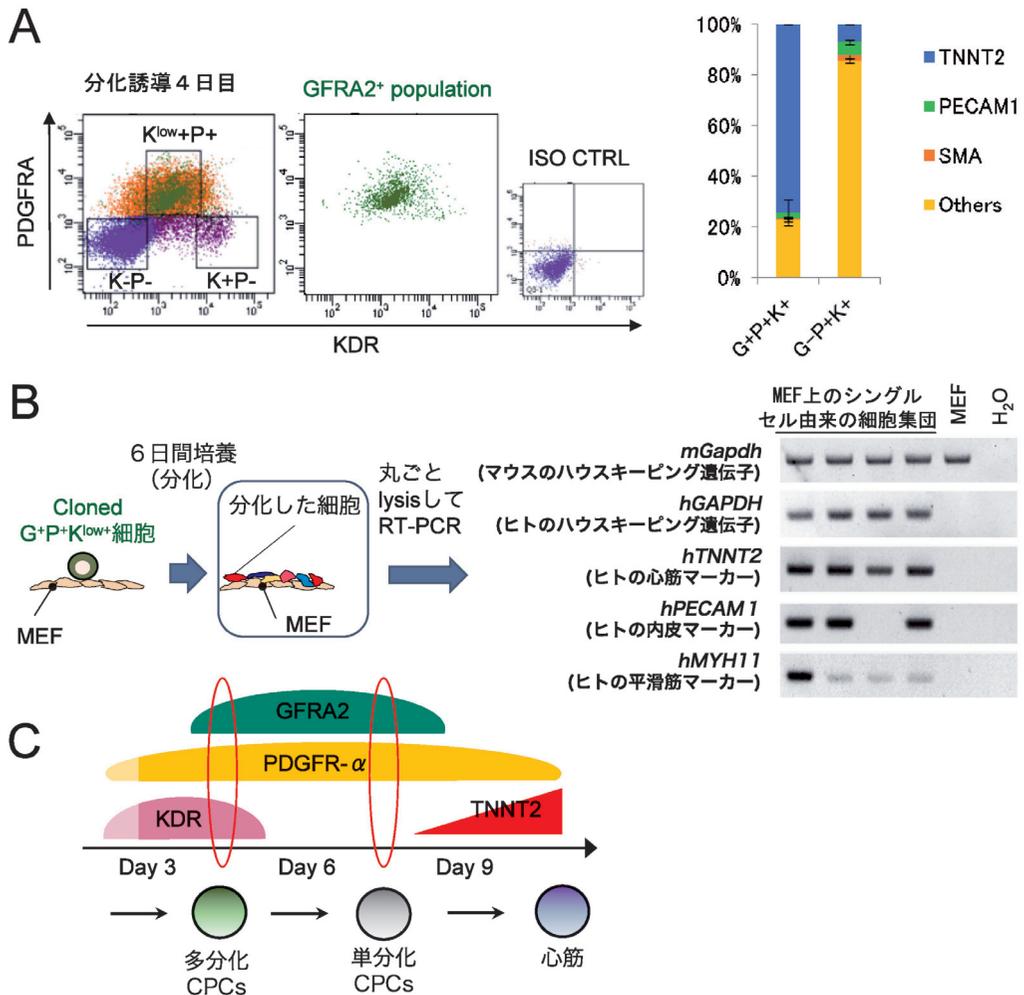


図3 GFRA2⁺/KDR^{low}+/PDGFRA⁺ CPCs の特質

- A. GFRA2⁺/KDR^{low}+/PDGFRA⁺ CPCs. ヒト ES 細胞へ心筋へと分化誘導をかけ、分化誘導後 4 日目にセルソーターにて解析した。従来、多分化能を有する CPCs と考えられていた KDR^{low}+/PDGFRA⁺ 細胞 (K^{low} + P⁺) の中で、GFRA2 を発現しているものはせいぜい 30~40% 程度に過ぎなかった。そこで、KDR^{low}+/PDGFRA⁺ 細胞を GFRA2 陽性と陰性に分けて回収し、分化培養を継続したところ、GFRA2 陽性からは高効率に心筋を含む心臓に寄与する細胞成分が分化したのに対し、GFRA2 陰性の細胞集団からは、心筋はせいぜい数%程度で、内皮等を含めても 10% に過ぎない細胞しか循環器系の細胞へと分化できなかった。
- B. GFRA2⁺/KDR^{low}+/PDGFRA⁺ CPCs の多分化能. シングルセルの GFRA2⁺/KDR^{low}+/PDGFRA⁺ CPC を、セルソーターを用いて細胞死を避けるために MEF のレイヤー上へと単離し、分化培養を継続した。この単一の CPC 由来のクローン細胞集団に対して RT-PCR をおこなったところ、心筋、内皮、平滑筋の各マーカーの発現を観察した。MEF: mouse embryonic fibroblasts.
- C. GFRA2 陽性細胞分化のモデル. 詳細は、本文を参照。
- 図は、全て文献 8 より改変し引用 (CC by 4.0)。

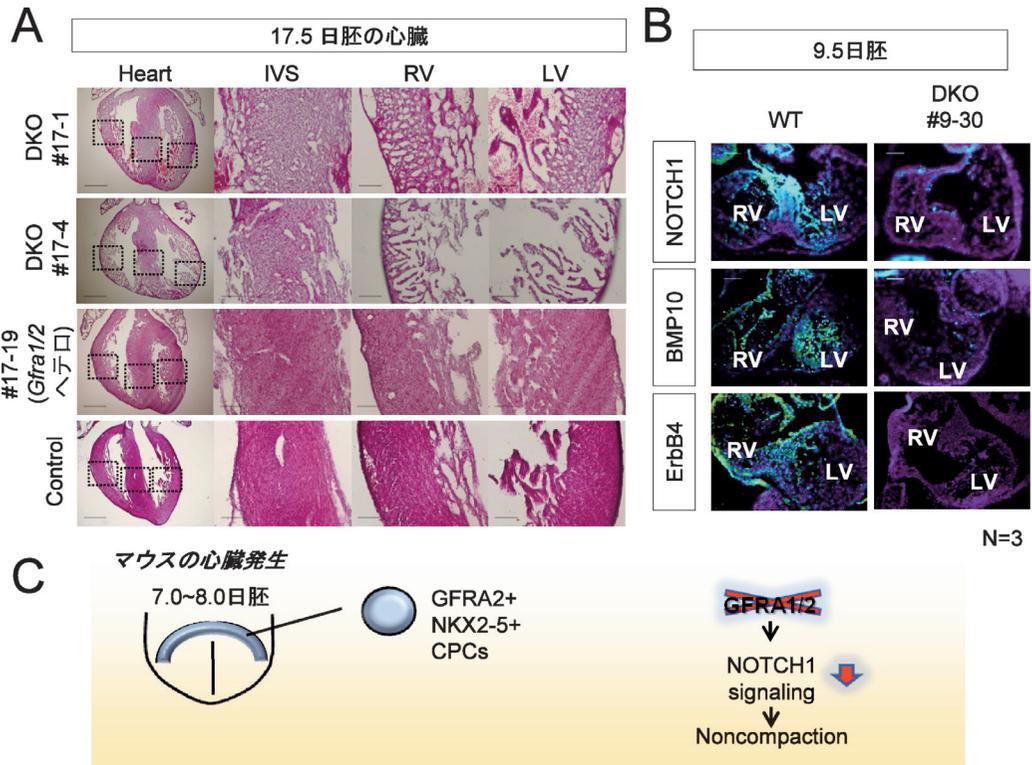


図4 *Gfra2*を介したシグナルの心筋緻密化に対する必要性

- A. CRISPR/Cas9を用いた *Gfra1/Gfra2* 二重変異マウスで観察される心筋緻密化障害。CRISPR/Cas9を直接マウスの受精卵へ作用させることで、*Gfra1*と *Gfra2*に対してノックアウトを行なった。*Gfra1*単独のヌル変異、*Gfra2*単独のヌル変異、および *Gfra1/Gfra2* 二重ヘテロ変異では心臓に異常を観察しなかったが、*Gfra1/Gfra2* 二重ヌル変異 (DKO) では、心筋緻密化障害心筋症を呈していた。
- B. *Gfra1/Gfra2* 二重ヌル変異 (DKO) マウス胚における NOTCH シグナルの異常。DKO の胚では、いずれも心筋緻密化過程に必要な NOTCH1, BMP10, そして ErbB4 タンパクの発現の著しい低下を観察した。
- C. 心臓発生における GFRA2 の機能に関するモデル。詳細は、本文を参照。図は、全て文献8より改変し引用 (CC by 4.0)。

線維芽細胞様の間葉系の細胞へと分化してしまい、心臓を構成する細胞へはあまり分化しなかった。したがって、従来、多分化CPCsだと考えられてきた $KDR^{low+}/PDGFRA^{+}$ 細胞は不均一な細胞集団で、せいぜい全体の約4割を占める程度までしかCPCsが濃縮されていないことが判明した。さらに、 $GFRA2^{+}/KDR^{low+}/PDGFRA^{+}$ 細胞が多分化能CPCsであるかどうかを検証した (図3B)。分化誘導をかけたヒトES細胞から、

分化4日目にクローン・ソーティングによって (単一細胞になったために生じる細胞死を避けるために) マウス胚線維芽細胞 (MEF) のレイヤー上へとシングルセルの $GFRA2^{+}/KDR^{low+}/PDGFRA^{+}$ 細胞を回収し、分化培養を継続した。クローン・ソーティング後6日目に、MEFのレイヤーごと単一の $GFRA2^{+}/KDR^{low+}/PDGFRA^{+}$ 細胞から分化してきたクローン細胞集団を回収し、この細胞集団に対して心筋・平滑筋・内皮

のマーカー遺伝子（それぞれ、*TNNT2*, *MYH11*, *PECAM1*）のRT-PCRを行なった。その結果、クローンの細胞集団に対して複数の細胞系譜のマーカーの発現が確認された。この事実は、たったひとつのGFRA2⁺/KDR^{low}⁺/PDGFRA⁺細胞から、心筋・平滑筋・内皮の3つの細胞系譜がいずれも分化してきたことを示しており、GFRA2⁺/KDR^{low}⁺/PDGFRA⁺細胞は多分化能を有するCPCsであると結論づけた。前述した分化誘導後8日目の心筋にしか分化できないGFRA2⁺細胞は、KDRの発現を完全に消失したGFRA2⁺/KDR^{neg}/PDGFRA⁺細胞であった⁸⁾。

以上の結果をまとめると、まずCPCsはGFRA2⁺/KDR^{low}⁺/PDGFRA⁺多分化CPCsとして発生する（図3C）。さらに分化が進むとKDRの発現を消失し、GFRA2⁺/KDR^{neg}/PDGFRA⁺として心筋単分化CPCsへと分化し、次いで心筋へと最終分化を遂げることが明らかになった。

GFRA2の心臓発生に果たす役割

CPCsに特異的に*Gfra2*が発現しているからには、何か生理的な役割を果たしているはずである。ところが、報告されている*Gfra2*変異マウスでは、神経堤由来の末梢神経に異常を認める以外、心臓の形態および機能的な異常は報告されていない^{10,11)}。また、古典的なGFRA2を介するシグナルには、原癌遺伝子でもあるチロシナーゼ活性を有する膜タンパクRETが必要であるが、*Ret*変異マウスでも心臓の異常は報告されていない^{12,14)}。一方で、*Ret*の発現が見当たらない組織での*Gfra2*の発現が観察されていることから、*Ret*に依存しない新規シグナル経路の存在も示唆されていた¹⁵⁾。そこで、私たちは*Gfra2*遺伝子が心臓発生に果たす役割を解析するべく、まずはCRISPR/Cas9を受精卵へ直接作用させることで*Gfra2*変異マウスを作成した⁸⁾。その結果、先行研究に矛盾なく、*Gfra2*変異マウスには心臓の形態異常を見いだすことはできなかった。一方で、系統発生的に*Gfra2*の類縁で機能的な冗長性も有する*Gfra1*遺伝子が⁸⁾、*Gfra2*のノックアウトの影響をマスクしてしまっている可能性も考えられた¹⁵⁾。そこで*Gfra1*と*Gfra2*の二重

変異マウスを作成したところ、心筋緻密化障害心筋症を生じることが判明した（図4A）。したがって、*Gfra1*と*Gfra2*は心臓発生においてもお互いに機能的冗長であり、かつ*Ret*非依存的な新規シグナル経路が心室壁の成熟過程である心筋緻密化に必要なと言える。

それでは、*Gfra1/2*の機能異常が何をもたらすために、心筋緻密化過程に異常が生じるのだろうか。従来の研究から、心筋緻密化にはNOTCH1シグナルが活性化し、Neureglinの受容体ErbB2/4の発現とBMP10の発現が維持されることが必要であることが示されてきた。これらの因子の発現を*Gfra1/2*二重変異マウスで確認したところ、NOTCH1, BMP10, ErbB4のいずれもが著しい発現低下を呈していることが判明した。したがって、*Gfra1/2*は、これらの心筋緻密化に重要であるシグナル経路を上流で制御していることが明らかとなった。

おわりに

それでは、*Gfra1/2*を介した新規シグナル経路の本態はいったいどのようなものなのであろうか。我々は、GFRA1で報告されているようなNCAM1に依存したFYN/ERKを介するシグナル経路を想定したが¹⁵⁻¹⁷⁾、CPCsおよび心臓の系譜ではNCAM1の発現を確認することができなかった。また、*Gfra1/2*の二重変異にてFYN/ERKのリン酸化状態に異常は生じていなかったことから、NCAM1とは全く異なる分子を介した未知のシグナル経路であることは明らかだった。残念ながら、本研究ではまだその本態を突き止めるに至っていない。この心臓発生に関わるGFRA2を介したシグナル経路を突き止めることは今後の研究課題であり、これを解明することによって、予後が不良で未知な部分の多い心筋緻密化障害心筋症の病理病態解明に向け、新たな基盤を提供できるものと信じてやまない。

一方で、GFRA2と他の中胚葉系マーカーと組み合わせることによってかつて無いほどの高純度なCPCsを単離でき、かつ多分化CPCsと心筋へとすでにコミットしてしまっている単分化

CPCsを用途に応じて分けて分離できることの意義は大きい。従来から開発されてきた未分化細胞除去の方法論と組み合わせることで、単分化CPCsは「心筋にしか分化できない」が故に、再生医療用途において非常に使い勝手の良い細胞集団であると考えられる。また、多分化CPCsと単分化CPCsを比較することで心筋分化に対して新しい知見を見出せる可能性も期待できる。何よりも、心筋にしか分化できない細胞を単離し、これを継時的に生きた状態で観察できるようになったことで（従来の方法では、多分化CPCsしか集めることができなかったのもので、どの細胞が心筋になるのかわからない）、心筋が心筋としての構造を確立して行く過程、例えばどのようにサルコメアの構造が細胞内でアッセムブリされてくるのかなどを詳細に解析できるようになることは、基礎科学的視点から重要な知見と言える。

今後は、以上のような背景を踏まえ、ここで得られた知見を活用し、心臓発生の分子機構の理解をさらに深く掘り下げ、再生医療的な応用研究を進展させたいと希望している。

謝 辞

本研究は、英国ロンドン大学メアリ女王校

(QMUL)・パーツ&ロンドン医科歯科大学 ウィリアム・ハーベイ研究所にて、MRC New Investigator Research Grant (G0900105) と MRC Research Grant (MR/J007625/1) の助成を受け、著者と現大阪大学大学院医学系研究科小児科学教室の石田秀和助教が中心に、多くの先生方の助力と助言によって実施された。動物実験は、英国のAnimal (Scientific Procedures) Act 1986と学内承認・規定に従い（プロジェクト・ライセンス70/7254, 80/2452, および27-028-001）、ヒトES細胞を用いた実験は、英国における認可（reference number; SCSC13-25）の下に実施された。特に、Anna-Katerina Hadjantonakis教授（スローン・ケータリングがんセンター, USA）、Marika Charalambous博士（Kings College London, UK）、大津欣也教授（KCL, UK）、濱田博司教授（理化学研究所神戸）、Tristan MacKay博士（QMUL, UK）、鈴木憲教授（QMUL, UK）、Tim Mohun教授（Francis Crick Institute, UK）、そして澤芳樹教授（大阪大学）にはこの場を借りて深謝申し上げます。

開示すべき潜在的利益相反状態はない。

文 献

- 1) Rana MS, Christoffels VM, Moorman AF. A molecular and genetic outline of cardiac morphogenesis. *Acta Physiol*, 207: 588-615, 2013.
- 2) Yashiro K, Suzuki K. Single-Cell Expression Analyses of Embryonic Cardiac Progenitor Cells. In: Nakanishi T, Markwald RR, Baldwin HS, Keller BB, Srivastava D, Yamagishi H, eds. *Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease: From Gene Function and Cellular Interaction to Morphology*, 85-91, 2016.
- 3) Nelson TJ, Faustino RS, Chiriac A, Crespo-Diaz R, Behfar A, Terzic A. CXCR4 + /FLK-1 + biomarkers select a cardiopoietic lineage from embryonic stem cells. *Stem Cells*, 26: 1464-1473, 2008.
- 4) Kattman SJ, Huber TL, Keller GM. Multipotent flk-1 + cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Dev Cell*, 11: 723-732, 2006.
- 5) Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, et al. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR + embryonic-stem-cell-derived population. *Nature*, 453: 524-528, 2008.
- 6) Kattman SJ, Witty AD, Gagliardi M, et al. Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. *Cell Stem Cell*, 8: 228-240, 2011.
- 7) Hidaka K, Shirai M, Lee JK, et al. The cellular prion protein identifies bipotential cardiomyogenic progenitors. *Circ Res*, 106: 111-119, 2010.
- 8) Ishida H, Saba R, Kokkinopoulos I, et al. GFRA2 Identifies Cardiac Progenitors and Mediates

- Cardiomyocyte Differentiation in a RET-Independent Signaling Pathway. *Cell Rep*, 16: 1026-1038, 2016.
- 9) Spater D, Hansson EM, Zangi L, Chien KR. How to make a cardiomyocyte. *Development*, 141: 4418-4431, 2014.
 - 10) Rossi J, Luukko K, Poteryaev D, et al. Retarded growth and deficits in the enteric and parasympathetic nervous system in mice lacking GFR alpha2, a functional neurturin receptor. *Neuron*, 22: 243-252, 1999.
 - 11) Rossi J, Herzig KH, Voikar V, Hiltunen PH, Segerstrale M, Airaksinen MS. Alimentary tract innervation deficits and dysfunction in mice lacking GDNF family receptor alpha2. *J Clin Invest*, 112: 707-716, 2003.
 - 12) Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F, Pachnis V. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature*, 367: 380-383, 1994.
 - 13) Taraviras S, Marcos-Gutierrez CV, Durbec P, et al. Signalling by the RET receptor tyrosine kinase and its role in the development of the mammalian enteric nervous system. *Development*, 126: 2785-2797, 1999.
 - 14) Enomoto H, Crawford PA, Gorodinsky A, Heuckeroth RO, Johnson EM, Jr., Milbrandt J. RET signaling is essential for migration, axonal growth and axon guidance of developing sympathetic neurons. *Development*, 128: 3963-3974, 2001.
 - 15) Paratcha G, Ledda F. GDNF and GFRalpha: a versatile molecular complex for developing neurons. *Trends Neurosci*, 31: 384-391, 2008.
 - 16) Paratcha G, Ledda F, Ibanez CF. The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell*, 113: 867-879, 2003.
 - 17) Sjostrand D, Carlsson J, Paratcha G, Persson B, Ibanez CF. Disruption of the GDNF binding site in NCAM dissociates ligand binding and homophilic cell adhesion. *J Biol Chem*, 282: 12734-12740, 2007.

著者プロフィール



八代 健太 Kenta Yashiro

所属・職：京都府立医科大学大学院医学研究科生体機能形態科学・教授

略歴：1993年3月 大阪大学 医学部医学科 卒業

1993年6月－1995年5月

大阪大学医学部附属病院 小児科/ICU 研修医

1995年6月－1996年5月

石井記念愛染園付属愛染橋病院 小児科

2000年3月

大阪大学大学院医学系研究科博士課程修了（医学博士）

2000年4月－2005年10月

大阪大学細胞生体工学センター 博士研究員

2005年11月－2007年8月

大阪大学 大学院生命機能研究科 助手
(2007年度より名称変更により助教)

2007年9月－2010年9月

ロンドン大学メアリ女王校医学部 講師

2010年10月－2016年7月

ロンドン大学メアリ女王校医学部 上席講師

2016年8月－2018年10月

大阪大学大学院医学系研究科心臓再生医療学共同研究講座
特任准教授（常勤）

2018年11月－現在 現職

専門分野：解剖学，発生学，小児循環器学

- 主要業績：1. Nabeshima, R., Nishimura, O., Maeda, T., Shimizu, N., Ide, T., Yashiro, K., Sakai, Y., Meno, C., Kadota, M., Shiratori, H., Kuraku, S. & Hamada, H. Loss of Fam60a, a Sin3a subunit, results in embryonic lethality and is associated with aberrant methylation at a subset of gene promoters. *Elife*, **7**: 2018.
2. Bridge, K.S., Shah, K.M., Li, Y., Foxler, D.E., Wong, S.C.K., Miller, D.C., Davidson, K.M., Foster, J.G., Rose, R., Hodgkinson, M.R., Ribeiro, P.S., Aboobaker, A.A., Yashiro, K., Wang, X., Graves, P.R., Plevin, M.J., Lagos, D. & Sharp, T.V. Argonaute Utilization for miRNA Silencing Is Determined by Phosphorylation-Dependent Recruitment of LIM-Domain-Containing Proteins. *Cell Rep*, **20**: 173-187, 2017.
4. Shiraishi, M., Shintani, Y., Shintani, Y., Ishida, H., Saba, R., Yamaguchi, A., Adachi, H., Yashiro, K. & Suzuki, K. Alternatively activated macrophages determine repair of the infarcted adult murine heart. *J Clin Invest*, **126**: 2151-2166, 2016.
5. Ishida, H., Saba, R., Kokkinopoulos, I., Hashimoto, M., Yamaguchi, O., Nowotschin, S., Shiraishi, M., Ruchaya, P., Miller, D., Harmer, S., Poliandri, A., Kogaki, S., Sakata, Y., Dunkel, L., Tinker, A., Hadjantonakis, A.K., Sawa, Y., Sasaki, H., Ozono, K., Suzuki, K. & Yashiro, K. GFRA2 Identifies Cardiac Progenitors and Mediates Cardiomyocyte Differentiation in a RET-Independent Signaling Pathway. *Cell Rep*, **16**: 1026-1038, 2016.
6. Kokkinopoulos, I., Ishida, H., Saba, R., Ruchaya, P., Cabrera, C., Struebig, M., Barnes, M., Terry, A., Kaneko, M., Shintani, Y., Coppen, S., Shiratori, H., Ameen, T., Mein, C., Hamada, H., Suzuki, K. & Yashiro, K. Single-Cell Expression Profiling Reveals a Dynamic State of Cardiac Precursor Cells in the Early Mouse Embryo. *PLoS One*, **10**: e0140831, 2015.
7. Shintani, Y., Drexler, H.C., Kioka, H., Terracciano, C.M., Coppen, S.R., Imamura, H., Akao, M., Nakai, J., Wheeler, A.P., Higo, S., Nakayama, H., Takashima, S., Yashiro, K. & Suzuki, K. Toll-like receptor 9 protects non-immune cells from stress by modulating mitochondrial ATP synthesis through the inhibition of SERCA2. *EMBO reports*, **15**: 438-445, 2014.
8. Shintani, Y., Kapoor, A., Kaneko, M., Smolenski, R.T., D'Acquisto, F., Coppen, S.R., Harada-Shoji, N., Lee, H.J., Thiemermann, C., Takashima, S., Yashiro, K. & Suzuki, K. TLR9 mediates cellular protection by modulating energy metabolism in cardiomyocytes and neurons. *PNAS*, **110**: 5109-5114, 2013.
9. Brouillette, S., Kuersten, S., Mein, C., Bozek, M., Terry, A., Dias, K.R., Bhaw-Rosun, L., Shintani, Y., Coppen, S., Ikebe, C., Sawhney, V., Campbell, N., Kaneko, M., Tano, N., Ishida, H., Suzuki, K. & Yashiro, K. A simple and novel method for RNA-seq library preparation of single cell cDNA analysis by hyperactive Tn5 transposase. *Dev Dyn*, **241**: 1584-1590, 2012.
10. Yashiro, K., Shiratori, H. & Hamada, H. Haemodynamics determined by a genetic programme govern asymmetric development of the aortic arch. *Nature*, **450**: 285-288, 2007.

