

令和 2 年 7 月 14 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04725

研究課題名(和文)代謝とヒストン修飾の制御による安全かつ効率的な心筋細胞リプログラミング法の確立

研究課題名(英文) Establishment of safe and efficient cardiac reprogramming methods by controlling intracellular metabolism and histone modification.

研究代表者

川村 晃久 (KAWAMURA, Teruhisa)

立命館大学・生命科学部・准教授

研究者番号：90393199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者はこれまで、人工多能性幹細胞への初期化誘導過程の細胞から、腫瘍リスクを回避して心筋細胞を生み出す特定の細胞集団を同定した。そこで、本研究では、初期化誘導過程で代謝とエピジェネティクスを制御することで線維芽細胞から直接的に心筋細胞を誘導し、安全かつ効率的な心臓再生療法の確立を目的とした。遺伝子発現阻害実験や、網羅的遺伝子発現解析およびメタボローム解析の結果から、中胚葉が形成される原腸陥入期から器官形成器に近い状態までの部分的な初期化状態から心筋細胞が誘導されることが、さらに、この誘導過程で好気性の代謝制御因子とクロマチン修飾に関わる因子が重要な役割を果たすことが見いだされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋細胞の脱落が激しい重篤な末期心不全を治療する方法の一つとして、多能性幹細胞から心筋細胞を分化誘導させ移植する再生療法の実現が期待されている。人工多能性幹細胞は、胚性幹細胞の弱点である倫理的問題や拒絶反応に伴う移植不全を解決できる一方で、移植後の腫瘍形成や株間の分化効率の相違、実用化のための高額な費用など解決すべき問題は多い。本研究では、研究代表者が独自に見出した手法に加え、代謝とクロマチン修飾に関連する制御因子を利用して、安全かつ効率的に心筋細胞を作製する方法を開発した。この研究成果は、安全かつ効率的な心筋再生のための新たなツールとしてその実用化が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Although induced pluripotent stem (iPS) cell-based cardiac regeneration therapy has been expected, safety, costs, and duration of iPS cell derivation are considered as barriers against the clinical application. To overcome these problems, we modified the reprogramming process and created cardiac myocytes directly from fibroblasts rapidly and efficiently with few risks of tumorigenesis. Cardiac myocytes were induced from four factor-mediated reprogramming fibroblasts, while these cells are not susceptible to iPS cell formation. Global gene expression analysis and metabolome analysis revealed that these reprogramming cells seem to be early mesodermal cells including cardiac progenitors but not iPS progenitor cells. In addition, this cardiac reprogramming is promoted by activation of aerobic metabolism and chromatin-modifying enzymes. The results above may contribute to establishment of the novel strategy for safe and efficient cardiac regeneration therapy.

研究分野：再生医学、ゲノム医科学

キーワード：再生医学 幹細胞生物学 リプログラミング 細胞内代謝

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

心筋細胞の脱落が激しい重篤な末期心不全を治療する方法の一つとして、多能性幹細胞から心筋細胞を分化誘導させ移植する再生療法の実現が期待されている。人工多能性幹 (iPS) 細胞は、胚性幹 (ES) 細胞の弱点である倫理的問題や拒絶反応に伴う移植不全を解決できる一方で、移植後の腫瘍形成や株間の分化効率の相違、実用化のための高額な費用など解決すべき問題は多い。

研究代表者らはこれまで、iPS 細胞が形成される過程 (= 初期化) で、DNA 損傷などストレスシグナルが活性化されること、これに呼応してがん抑制遺伝子 p53 が iPS 細胞形成を抑制するといった、効率と安全性に関する極めて重要な事実を報告してきた。さらに、iPS 細胞の持つ弱点を克服し多量の心筋細胞を生み出す特定の細胞集団を初期化誘導過程の中から同定することにも成功した。また、心筋分化に必要な心筋特異的遺伝子発現において、ヒストンや転写因子のアセチル化の重要性を報告し、最近では、細胞内代謝がアセチル化に関与し心筋細胞誘導のみならず抗腫瘍作用を有している可能性も見いだした。

一方で、iPS 細胞を用いない別の方法として、線維芽細胞に 3 つの神経特異的転写因子を発現させることにより機能的な神経細胞を、心筋特異的転写因子の発現により心筋細胞を作製する報告もなされてきた。このように遺伝子導入により直接目的の細胞腫へ転換誘導する手法は、ダイレクトリプログラミングと呼ばれ、安全 (腫瘍形成リスクの軽減) かつ効率的 (低コストで俊敏) な再生医療の強力なツールとして注目されている。今後も、さらなる安全性や転換効率の向上などに関する研究成果が期待されている分野の一つといえる。

### 2. 研究の目的

本研究では、我々を含む研究グループによる上記の先行研究の知見をもとに、初期化誘導過程で代謝とアセチル化を制御することで線維芽細胞から直接的に心筋細胞を誘導し、安全かつ効率的な心臓再生療法の確立を目指す。ヒストンや転写因子のアセチル化修飾といったエピジェネティクスと細胞内代謝との間には密接なクロストークがあることが近年の研究から示唆されており、本研究は、エピジェネティクスと代謝とが病態発症にかかわる癌やメタボリック症候群などの治療に対する新たな標的分子の同定にも繋がる重要課題と考えられる。

### 3. 研究の方法

マウス胎仔あるいはヒト胎児由来の線維芽細胞へ、ウイルスベクターにより初期化 4 因子 (Oct4, Sox2, Klf4, cMyc) または、心筋特異的転写因子 (Gata4, Mef2c, Tbx5) を遺伝子導入して心筋細胞誘導実験を行い、下記の 2 つの実験を施行した。

実験 1: 初期化 4 因子を用いた心筋細胞誘導

実験 2: 心筋特異的転写因子を用いたダイレクトリプログラミング法による心筋細胞誘導

#### (1) 細胞培養

13.5 日マウス胎仔由来の線維芽細胞あるいはヒト胎児由来線維芽細胞 (IMR90) を採取した。実験 1 では、導入 2 日目から ES 細胞の培養条件にて初期化を誘導し、誘導過程 5~7 日で出現する心筋細胞誘導候補となる細胞群をセルソーターを用いて選別し解析に用いた。

#### (2) 遺伝子導入

初期化 4 因子 Oct4, Sox2, Klf4, cMyc または、心筋特異的転写因子 Gata4, Mef2c, Tbx5 の遺伝子導入はレトロウイルスベクターで、ノックダウンのための shRNA の発現にはレンチウイルスベクターを用いた。それぞれのウイルスベクターはともに、Package 細胞にウイルス作製のプラスミドを lipofection にて一過性発現させ培養上清を採取し、ポリプレックスと共に培養線維芽細胞へ添加した。

#### (3) 遺伝子発現解析

遺伝子発現解析では、iPS 細胞誘導後、各時系列毎に RNA を採取し遺伝子の発現を QPCR 法あるいは、Microarray 法あるいは RNA sequence により解析した。

#### (4) 免疫染色

セルソーティングしてから 7 日前後に、iPS 細胞の最も特異的なマーカー遺伝子である Nanog に対する抗体を用いて ABC 法にて染色を行った。Nanog 陽性細胞で形成されるコロニーの数をカウントすることにより iPS 細胞形成効率 (= 初期化効率) を評価した。誘導した心筋細胞に対しては、-sarcomeric actinin などに対する抗体を用いた蛍光免疫染色により形態とマーカー蛋白質の発現を評価した。

#### (5) 細胞内代謝解析・メタボローム解析

培養細胞または細胞選別後の細胞を 5% D - マンニトール液で洗浄後、Human Metabolome Technologies 社のプロトコルに沿って抽出液を限外ろ過したのち、CE-TOF-MS (capillary electrophoresis-time of flight-mass spectrometry) 解析を行った。各代謝産物の細胞内量については、SIGMA Aldrich 社のキットを用いて定量解析を施行した。

### 4. 研究成果

実験 1: 初期化 4 因子を用いた心筋細胞誘導

初期化誘導過程で発現する表面マーカーにより、セルソーターで細胞選別を行い無血清かつ浮遊状態で培養を継続させることにより効率的な心筋細胞誘導法を確立した。網羅的遺伝子発

現解析やメタボローム解析の結果、好気性代謝経路の活性化により心筋細胞誘導効率が高まると考えられた。また、好気性代謝の制御因子が効率的な心筋細胞誘導に関わることも見いだされた。さらに、Tet-On システムにより初期化 4 因子の発現を時期特異的に制御することによる心筋細胞誘導実験も施行した。Tet-On レンチウイルスベクターをマウス胎仔線維芽細胞に感染させた日を d0 として、誘導 2 日目 (d2) から血清含有培地に Doxycycline (Dox) を加えて培養し、d5 から無血清培地にてスフィア形成を行い、d11 から血清含有培地による接着培養に戻してから自己拍動性細胞の有無を観察した。4F の発現期間として、Dox 刺激を d2~5、d2~8、d2~11 の 3 通りで行い心筋細胞誘導効率をスフィアの自己拍動率を指標に比較した。4F の発現期間として Dox 刺激が d2~5 では自己拍動性のコロニーは認めず、d2~8 あるいは d2~11 まで刺激を行った場合は自己拍動性のコロニーが観察された。以後の実験では、4F の発現期間を最小限に抑えるため、Dox 刺激は d2~8 で統一して行い、心筋細胞誘導の分子機構を解明するため、d4 からレンチウイルスベクターを用いて shRNA を細胞に発現させて遺伝子発現阻害を行った。iPS 細胞形成やその未分化性の維持に必要とされる遺伝子 Nanog の発現を阻害しても自己拍動率の低下は認められなかったが、心筋前駆細胞を含む中胚葉系列への前駆細胞のマーカー遺伝子 Mesp1 に対するノックダウンでは自己拍動率が Mock と比較して約半分に減少したことが確認された。この結果から、初期化 4 因子により、iPS 細胞への完全な初期化を介することなく、中胚葉系列への前駆細胞を経て心筋細胞が誘導される可能性が示唆された。最後に、メタボローム解析から得られた情報をもとに、代謝制御因子とクロマチン修飾因子に着目して、心筋細胞誘導効率を高めるために重要な因子を探索した。候補因子に対する shRNA を用いてノックダウンを行うと誘導効率は著明に低下し、ノックダウンに対する救済刺激を行うと誘導効率が回復することも確認された。以上の結果から、中胚葉が形成される原腸陥入期から器官形成器に近い状態までの部分的な初期化状態から心筋細胞が誘導されること、さらに、この誘導過程で好気性の代謝制御因子とクロマチン修飾に関わる因子が重要な役割を果たすことが示唆された (図 1)。

#### 実験 2：心筋特異的転写因子を用いたダイレクトリプログラミング法による心筋細胞誘導

iPS 細胞形成に必要な初期化 4 因子を用いず俊敏かつ安全に心筋細胞を再生させる方法として、3 種類の心筋特異的転写因子 Gata4、Mef2c、Tbx5 (以下 GMT と表記) を強制発現させることにより線維芽細胞から直接的に誘導性心筋細胞 (iCM) を作製する研究も報告され注目されている。しかし、誘導過程における詳細なメカニズムについては不明な点が多く、心筋細胞は極めて増殖能に乏しい細胞であることから、得られる iCM の細胞数が少ないことが弱点のひとつとなっている。そこで、この実験では、効率的な心筋再生療法への貢献を目指し、iCM 誘導過程で細胞内代謝が如何に制御されているかについても検証した。はじめに、GMT が細胞内代謝に与える影響を調べるため、細胞内 ATP 量の測定を行った。mock と比較して各遺伝子単独導入群では大きな変化はみられなかったが、GMT 同時導入群では細胞内 ATP 量が亢進することが確認された。次に、心筋細胞における好気性代謝に大きな役割を果たしている制御因子を探索したところ候補遺伝子 X、Y の発現量が GMT 同時導入群で亢進することが確認された。次に、上記の実験で iCM 形成との関係性が示唆された候補遺伝子 X について、さらに検証を進めるため、GMT と共発現させて iCM 誘導効率を比較した。QPCR により、mRNA レベルで心筋特異的遺伝子の発現を解析すると、遺伝子 X によりその遺伝子発現が亢進することが確認された。最後に、蛍光免疫染色による  $\alpha$ -actinin 陽性細胞の数を基に誘導効率を比較しても、GMT + mock と比較して遺伝子 X は誘導効率を上昇させることが確認された。

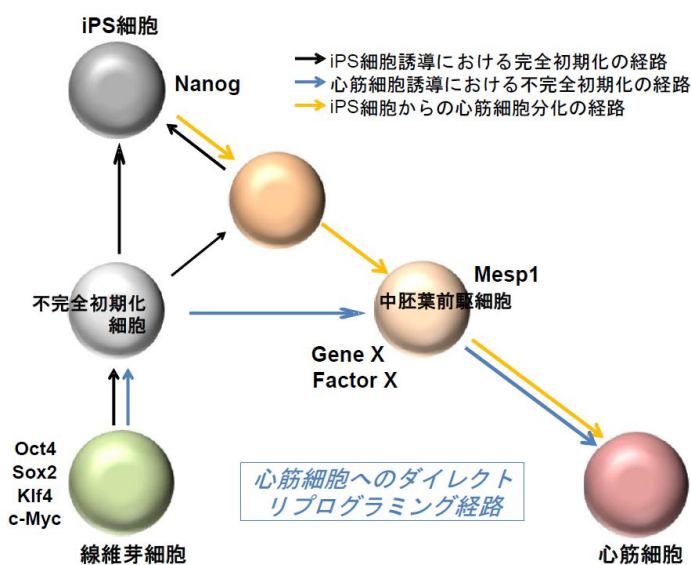


図 1. 部分的な初期化状態からの心筋細胞誘導

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishida T, Nakao S, Ueyama T, Harada Y, Kawamura T.	4. 巻 40
2. 論文標題 Metabolic remodeling during somatic cell reprogramming to induced pluripotent stem cells: involvement of hypoxia-inducible factor 1.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inflamm Regen.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-020-00117-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ihara D, Watanabe Y, Seya D, Arai Y, Isomoto Y, Nakano A, Kubo A, Ogura T, Kawamura T, Nakagawa O.	4. 巻 461
2. 論文標題 Expression of Hey2 transcription factor in the early embryonic ventricles is controlled through a distal enhancer by Tbx20 and Gata transcription factors.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dev Biol.	6. 最初と最後の頁 124-131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2020.02.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakao S, Tsukamoto T, Ueyama T, Kawamura T.	4. 巻 21
2. 論文標題 STAT3 for cardiac regenerative medicine: involvement in stem cell biology, pathophysiology, and bioengineering.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21061937.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsukamoto T, Sogo T, Ueyama T, Nakao S, Harada Y, Ihara D, Akagi Y, Kida YS, Hasegawa K, Nagamune T, Kawahara M, Kawamura T.	4. 巻 15
2. 論文標題 Chimeric G-CSF receptor-mediated STAT3 activation contributes to efficient induction of cardiomyocytes from mouse induced pluripotent stem cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biotechnol J	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/biot.201900052.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 深山俊治、瀬谷大貴、井原 大、川村晃久、渡邊裕介、中川 修	4. 巻 68
2. 論文標題 心臓・大血管の形態形成と転写調節因子	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 531-535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 榎岡博子、川村晃久、木田泰之	4. 巻 34
2. 論文標題 ERRによるメタボリックスイッチとiPS細胞誘導	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 2621-2624
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 石田智明、植山萌恵、井原 大、原田恭弘、赤間友美、徳永千尋、十河孝浩、中尾 周、川村晃久
2. 発表標題 iPS細胞への初期化に必要な代謝シフトにおける低酸素誘導因子HIF1の果たす役割
3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Teruhisa Kawamura
2. 発表標題 Dissecting the Process of Metabolic Shift during iPS Cell Reprogramming from Fibroblasts
3. 学会等名 23rd Annual Meeting of the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Dai Ihara , Yusuke Watanabe , Dailly Seya , Yukihiro Harada , Osamu Nakagawa , Teruhisa Kawamura
2. 発表標題 The mechanism of Hey2 expression in cardiac development
3. 学会等名 23rd Annual Meeting of the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy ( 国際学会 )
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoe Ueyama, Dai Ihara, Yukihiro Harada, Yuka Akagi, Daiki Arima, Sae Nakagawa, Takahiro Sogo, Shu Nakao, Teruhisa Kawamura
2. 発表標題 miR17-92 cluster promotes efficiency of direct reprogramming to induced cardiomyocytes
3. 学会等名 23rd Annual Meeting of the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy ( 国際学会 )
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tenghattakorn Araya , Tomomi Akama , Motoharu Yamasaki , Yukihiro Harada , Dai Ihara , Tomoe Ueyama , Takahiro Sogo , Shu Nakao , Teruhisa Kawamura
2. 発表標題 Transcription-independent functions of local p53: a possible target to improve cardiac cell therapy
3. 学会等名 23rd Annual Meeting of the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy ( 国際学会 )
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 赤間友美、山崎基春、植山萌恵、井原 大、原田恭弘、鳥居昇平、中川沙恵、赤木祐香、十河孝浩、中尾 周、川村晃久
2. 発表標題 iPS細胞へのリプログラミングにおける細胞質およびミトコンドリアに局在するp53の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井原 大、渡邊裕介、瀬谷大貴、磯本祥恵、川村晃久、中川 修
2. 発表標題 心臓発生におけるHey2の発現制御メカニズム解明
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 赤木祐香、原田 恭弘、植山萌恵、井原 大、中川沙恵、長谷川浩二、十河孝浩、中尾 周、川村晃久
2. 発表標題 ダイレクトリプログラミングによる線維芽細胞から心筋細胞および神経細胞への誘導制御に関する研究
3. 学会等名 第3回J-ISCIP学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中川沙恵、植山萌恵、井原 大、高木智史、中山宗哉、原田恭弘、赤木祐香、十河孝浩、川村晃久
2. 発表標題 iPS細胞形成過程におけるmiR17-92 clusterの役割とその標的遺伝子に関する研究
3. 学会等名 第38回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鳥居昇平、植山萌恵、塚本 輔、中山宗哉、原田恭弘、井原 大、中川沙恵、赤木祐香、山崎基春、十河孝浩、中尾 周、川村晃久
2. 発表標題 低酸素誘導因子HIF1がiPS細胞形成に果たす役割に関する研究
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会(2017年度生命科学系学会合同年次大会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 植山萌恵、原田恭弘、塚本 輔、井原 大、高木智史、赤木祐香、有馬大貴、鳥居昇平、中川沙恵、山崎基春、三原千明、十河孝浩、中尾周、川村晃久
2. 発表標題 miR17-92 clusterはダイレクトリプログラミングによる誘導性心筋細胞の形成効率を亢進させる
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会(2017年度生命科学系学会合同年次大会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 原田 恭弘、中山宗哉、高木智史、植山萌恵、塚本 輔、井原 大、成川智貴、十河孝浩、長谷川浩二、川村晃久
2. 発表標題 誘導性心筋細胞(iCM)へのダイレクトリプログラミングが細胞周期と代謝に与える影響
3. 学会等名 第2回 J- ISCP学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 川村晃久
2. 発表標題 体細胞からiPS細胞への初期化制御機構
3. 学会等名 第6回細胞再生医療研究会(招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 中山宗哉、高木智史、原田 恭弘、植山萌恵、塚本 輔、井原 大、大矢知佳、十河孝浩、川村晃久
2. 発表標題 iPS細胞誘導によるATP量の変動とそのメカニズムの解析
3. 学会等名 第89回日本生化学会大会
4. 発表年 2016年



1. 発表者名 原田恭弘、植山萌恵、塚本 輔、小原 惇、井原 大、中山宗哉、高木智史、十河孝浩、川村晃久
2. 発表標題 誘導性心筋細胞(iCM)へのダイレクトリプログラミングにおける細胞周期と代謝の変化
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 高木智史、植山萌恵、井原 大、塚本 輔、中山宗哉、原田 恭弘、小原 惇、川村晃久
2. 発表標題 miR17-92 cluster領域のゲノム編集によるiPS細胞形成過程の解析
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 人工多能性幹細胞、心筋細胞又はその前駆細胞の製造方法	発明者 川村晃久	権利者 国立大学法人京都大学
産業財産権の種類、番号 特許、第6312215号	取得年 2017年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

研究室ホームページ ~川村研究室へようこそ~ <a href="http://kawamura-lab.jp/index.html">http://kawamura-lab.jp/index.html</a>
---

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	中川 修  (NAKAGAWA Osamu)  (40283593)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター研究所・分子生理部・部長    (84404)	
連携研究者	木田 泰之  (KIDA Yasuyuki)  (20396526)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・主任研究員    (82626)	
連携研究者	尾野 巨  (ONO Koh)  (00359275)	京都大学・医学系研究科・准教授    (14301)	