

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17550

研究課題名(和文) 心筋ダイレクトリプログラミング法を利用した遺伝子治療用AAVベクターの開発

研究課題名(英文) Direct Reprogramming of Fibroblasts into Cardiomyocytes using Adeno-Associated Virus

研究代表者

磯見 まり (Isomi, Mari)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：60748490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、我々をはじめ多くの研究室で線維芽細胞から心筋細胞を直接誘導する心筋直接リプログラミングが報告されてきた。しかしながら、これまでの研究ではレトロウイルス、レンチウイルス、センダイウイルス等が用いられており、これらのベクターは臨床現場で使用するにはいくつかの課題があった。そこで、本研究では安全で効率的に導入遺伝子を発現させることのできるAAVベクターに着目し、このベクターを用いた心筋直接リプログラミングに成功した。今回の発見は新しい心臓の治療法開発への大きな一歩となると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心疾患は死因の上位を占めており、新しい治療として幹細胞由来の心筋を使用する再生医療や創薬応用が期待されている。ES/iPS細胞をはじめとした幹細胞はその有力な細胞源として活発に研究が行われているが、幹細胞から分化させた心筋細胞を用いた方法にはコストの問題、腫瘍化のリスク等いくつかの課題が残っている。我々はこの課題を克服するための新しい心臓再生法として心臓線維芽細胞から心筋細胞を直接誘導する心筋直接リプログラミング法の開発に取り組んできた。本研究では心筋直接リプログラミングを安全なAAVベクターを用いて行う方法を開発し、この技術を臨床応用へさらに前進させた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that AAV X-GMT could reprogram mouse fibroblasts into iCMs in vitro and in vivo.

Previously, we and others reported direct cardiac reprogramming using retroviral vector, lentiviral vector and Sendai virus vector. However, these vectors have some problems for clinical applications. Adeno-associated virus (AAV) vectors are widely used for gene delivery in vivo in clinics due to their efficiency and safety in transducing both dividing and non-dividing cells. Thus, our findings may prove to be useful for developing gene therapy targeting CFs to treat fibrosis, which is in high demand in cardiovascular research.

研究分野：心臓再生

キーワード：線維芽細胞 ウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

障害を受けた心臓は、心筋細胞が減少し心臓線維芽細胞が増殖することにより心機能の低下をきたし、最終的に心不全に至る。心筋細胞は終末分化細胞であるため再生能力がほとんどないことから、再生医療による治療法の確立が期待されている。再生医療技術の一つとして幹細胞から作製した心筋細胞を移植する方法が盛んに研究されており、iPS 細胞の発見により近年さらに加速している。しかし、幹細胞を用いた方法には残存した未分化細胞による腫瘍化のリスク、移植した心筋細胞の長期生着が困難なこと、作業工程が複雑で高コストであること等克服すべき課題がある。そこで我々は、これらの課題を解決し得る方法として、幹細胞を用いずに心臓に存在する線維芽細胞を体内で直接心筋細胞に転換する心筋直接リプログラミング法の開発に成功した(Ieda et al, Cell, 2010)。この方法では心臓特異的な転写因子 (Gata4、Mef2c、Tbx5) をレトロウイルスベクターを用いて線維芽細胞に導入する。レトロウイルスは導入遺伝子の発現効率に優れている一方で、宿主細胞の遺伝子に組み込まれることから挿入変異の危険性があるため臨床現場で使用するにはリスクが伴う。そこで近年我々は将来の臨床応用を見据えてより安全性の高いベクターを用いた直接リプログラミング法の確立に取り組んでいる。

センダイウイルス (SeV) ベクターは宿主の核内には入り込まず細胞質内でタンパク質を発現するため、挿入変異を起こさないという利点がある。我々はこれまでに、マウス心筋リプログラミング遺伝子を搭載した SeV ベクターを開発し、マウス線維芽細胞から心筋様細胞 (iCM 細胞) が誘導されることを確認した。さらに心筋作製効率はレトロウイルスベクターの 100 倍に改善することを見出した (Miyamoto et al. Cell Stem Cell, 2017)。また、マウス心筋梗塞モデルの心臓に投与し、生体内においても心筋再生が起ること、投与 1 か月後に心臓機能が改善することも確認している。しかしこのベクターは免疫原性を有し、臨床応用のためにはこの課題を克服する必要があった。

2. 研究の目的

AAV は病原性を持たないため安全性が高く、遺伝子治療用ベクターとして適していることから様々な分野で治療用 AAV ベクターの開発が進んでいる。既に欧米では遺伝子治療薬として承認され、臨床応用されている実績がある。そこで、目的の遺伝子を安全に運び、かつ効率よく発現するベクターとして本研究では AAV ベクターに着目した。これまでに心筋直接リプログラミングを目的とした AAV ベクターの報告はなく、これが実現すれば心筋直接リプログラミング法の臨床応用への大きな一歩となり得る。本研究では AAV ベクターに心筋リプログラミング因子を搭載してこれによる心筋誘導が可能かを検討し、安全な心筋再生遺伝子治療薬の開発を目指した。

3. 研究の方法

研究は以下の 3 つのステップで行った。

心筋直接リプログラミング法の適した AAV 血清型の同定

これまでに報告されている AAV の血清型は AAV1 ~ 10 の 10 種であり、各々が細胞や組織への感染特異性を有する。本研究の遺伝子導入のターゲットである心臓線維芽細胞に最も特異性の高い血清型を選定するため、各血清型の AAV-GFP を心臓線維芽細胞に感染させて細胞指向性を観察した。

心筋リプログラミング因子発現 AAV ベクターの作製

我々が発見した心筋リプログラミング因子 Gata4、Mef2c、Tbx5 に Hand2 を加えると心筋誘導効率が改善するという報告を踏まえ、上記 4 因子を発現する血清型 X の AAV ベクターを作製した (AAV-G/H/M/T)。

AAV-G/M/T/H による生体内心筋直接リプログラミングの検討

線維芽細胞リネージトレースマウスの冠動脈を結紮してマウス心筋梗塞モデルを作製した。このマウスの心臓に AAV-G/M/T/H を局所投与し、AAV ベクターによる生体内心筋リプログラミングを評価した。

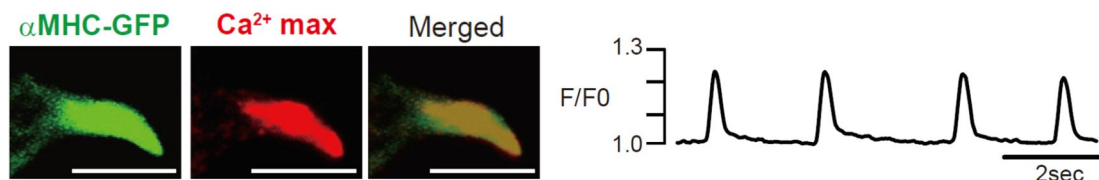
4. 研究成果

心筋直接リプログラミング法の適した AAV 血清型の同定

血清型 1 ~ 10 の AAV-GFP を心臓線維芽細胞に感染させて細胞指向性を観察した結果、血清型 X が培養細胞および生体内直接投与の両方で心臓線維芽細胞に親和性が高いことが明らかになった。

心筋リプログラミング因子発現 AAV ベクターの作製

マウス胎児線維芽細胞に AAV-G/M/T/H を同時に感染させ、感染 1 週間後の遺伝子発現を解析したところ、心筋マーカーである Tnnt2、Ryr2、Actc1 の上昇が認められ、iCM 細胞が誘導されることが示唆された。また FACS による解析で心筋特異的タンパク質 cTnT の発現も確認された。さらに 4 週間後には、Ca²⁺イメージング実験により心筋細胞に特徴的な Ca²⁺イオンの濃度変化が観察された (図)。



【図】誘導した iCM 細胞の Ca²⁺イメージング
心筋細胞の特徴である Ca²⁺イオンの流出入が観察された。

AAV-G/M/T/H による生体内心筋直接リプログラミングの検討

心筋梗塞モデルマウスの心臓に AAV-G/M/T/H を局所投与したところ、投与後 2 週および 4 週において心臓線維芽細胞由来の iCM 細胞が確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------