

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390216

研究課題名(和文) 心筋へのリプログラミングを誘導するエピジェネティック因子、マイクロRNAの同定

研究課題名(英文) Direct cardiac reprogramming by epigenetic factors and micro RNAs

研究代表者

家田 真樹 (Ieda, Masaki)

慶應義塾大学・医学部・特任講師

研究者番号：70296557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：これまで我々は転写因子による心筋リプログラミングを報告してきたが、マイクロRNAやエピジェネティック因子による心筋誘導、また心筋リプログラミングの分子制御機構は不明であった。本研究で我々は心筋リプログラミングを促進する心筋特異的マイクロRNAを同定することに成功した。次にこのマイクロRNAによる心筋リプログラミング促進効果の分子基盤を明らかにするため、経時的に誘導心筋細胞の遺伝子発現や生理機能を解析した。その結果、qRT-PCRでmiRNAによる心筋遺伝子の上昇がリプログラミング早期から認められること、マイクロアレイ解析でグローバルに線維芽細胞遺伝子の発現が低下することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Direct reprogramming of fibroblasts into cells of interest holds great promise for regenerative medicine. Generation of cardiomyocyte-like cells from mouse fibroblasts was achieved by transduction of Gata4, Mef2c, and Tbx5 (GMT). However, the induction of fully reprogrammed functional cardiomyocytes is inefficient and the reprogramming mechanisms remain undefined. Here we demonstrate that cardiac microRNA promotes direct cardiac reprogramming from mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and postnatal tail-tip fibroblasts. MiRNA overexpression with GMT transduction increased the generation rate of beating cardiomyocyte-like cells from MEFs by 7-fold compared to GMT alone, and shortened the duration to induce beating cells to 10 days. Molecularly, we found that fibroblast genes were suppressed early in reprogramming by miRNA overexpression. Thus, miRNA promotes direct cardiac reprogramming partly through silencing fibroblast signatures.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心臓 マイクロRNA 再生

1. 研究開始当初の背景

心臓病は死亡原因の常に上位を占め、新しい治療の開発が真に望まれる。心筋細胞は終末分化細胞で再生できないため、心臓は一度障害を受けると線維芽細胞の増殖により癒痕化し心機能は低下する。iPS 細胞を初めとした幹細胞は心臓再生医療の細胞源として期待され世界中で活発に研究が行われているが、その使用には分化誘導効率、腫瘍形成の可能性、細胞の生着の問題など様々な問題が指摘されている。もし心臓内に多数存在する心臓線維芽細胞を生体内で直接心筋細胞に高率に転換できたらこれらの問題を一気に解決できる可能性がある。1987年に骨格筋のマスター遺伝子 MyoD が発見されてから、体細胞を心筋に転換できる心筋のマスター遺伝子探しが世界中で行われたがこれまで20年以上も成功していなかった。またいかなる方法を用いても、体細胞から心筋細胞を直接誘導できたという報告はこれまで皆無であった。しかし近年の複数の転写因子の導入による iPS 細胞の樹立は体細胞の可塑性を示しており、また単数ではなく複数の因子を導入することで目的の細胞にリプログラミングできる可能性を示している。

iPS 細胞の樹立は最初 ES 細胞に特異的に発現し機能が重要と考えられた4つの転写因子をマウス線維芽細胞に同時に導入することで示され、続いてヒト細胞でも同様の結果が報告された (Takahashi, Cell, 2006, Takahashi, Cell, 2007)。また最近では、細胞種特異的に発現する転写因子を複数導入することにより、体細胞から直接目的の細胞に分化転換できるということが報告された。まず成獣のすい臓に直接3つの転写因子 Neurogenin 3, Pdx1, Mafa を導入することで、すい臓の外分泌細胞がベータ細胞に転換することが示された (Zhou, Nature, 2008)。さらに線維芽細胞に Ascl1, Brn2, Myt1l の3つの転写因子を導入することにより、線維芽細胞から神経細胞が誘導されることが示された (Vierbuchen, Nature, 2010)。

我々はこれらの報告より心筋細胞特異的に発現し、かつ心臓形成に重要な遺伝子群を複数組み合わせることで線維芽細胞に導入することで心筋細胞への直接リプログラミングが可能であるという仮説を立てた。まず心筋細胞に特異的に発現する遺伝子を明らかにするため、これまで困難であった心筋細胞と心臓線維芽細胞の FACS による高純度細胞選別法を開発した。この高純度細胞選別法を用い遺伝子発現をマイクロアレイで解析した結果、心筋細胞で特異的に発現する遺伝子群を同定することができた (Ieda M, Dev Cell, 2009)。この心筋特異的に発現する遺伝子という条件と、ノックアウトマウスが胎生致死かつ心奇形を有するという条件の両方を満たす14の遺伝子を心筋リプログラミングの候補因子と考えてスクリーニングを開始した。その結果、14因子の同時導入により1.7%

の線維芽細胞が心筋様細胞に転換することがわかった。さらにその14因子の中で心筋リプログラミング因子を絞った結果、心臓発生に重要な3つの転写因子 (Gata4, Mef2c, Tbx5) の同時導入で17%の線維芽細胞が iPS 細胞を介さずに直接心筋様細胞 (iCM 細胞、Induced Cardiomyocytes) に転換することを確認した。誘導された iCM 細胞では心筋特異的蛋白の発現、心筋細胞に類似したグローバルな遺伝子発現パターンやエピジェネティックな変化、自律的な細胞の拍動が認められた。また3因子をあらかじめ導入した線維芽細胞をマウス心臓内に移植したところ心筋細胞への分化転換も観察された。以上より体細胞から心筋細胞への直接リプログラミングに成功した (Ieda M, Cell, 2010)。

しかし iPS 細胞をはじめとしてこれまで細胞リプログラミングの分子機構は不明であり、その解明は目的細胞への誘導効率を上げるためにも必須である。近年、グローバルに遺伝子発現を制御するマイクロ RNA やエピジェネティック因子も細胞リプログラミングに関与することが報告されたが、詳細はいまだ不明である (Kim, Nature, 2010)。そこで本研究では心筋リプログラミングの分子基盤の解明、特にマイクロ RNA やエピジェネティック因子によるリプログラミング制御機構を明らかにする。またその結果得られる知見より心筋誘導効率のさらなる改善を目指す。

2. 研究の目的

心臓再生研究において iPS 細胞を初めとした幹細胞は心筋再生の細胞源として期待されるが、その使用には分化誘導効率、腫瘍形成の可能性、移植細胞の生着率など問題がある。心臓内在性の線維芽細胞を直接その場で高率に心筋に転換できたらこれらの問題を一気に解決できる。我々は心臓線維芽細胞に3つの心筋特異的転写因子を導入し、心筋への直接リプログラミング (分化転換) に成功した (Ieda M, Cell, 2010)。しかし iPS 細胞樹立をはじめ細胞リプログラミングの分子機構はいまだ不明であり、またリプログラミング効率も十分でない。本研究では心筋リプログラミング過程で誘導されるマイクロ RNA やエピジェネティック因子による細胞リプログラミング制御機構を解明する。またこれらの因子を用いて心筋誘導効率の改善を目指す。

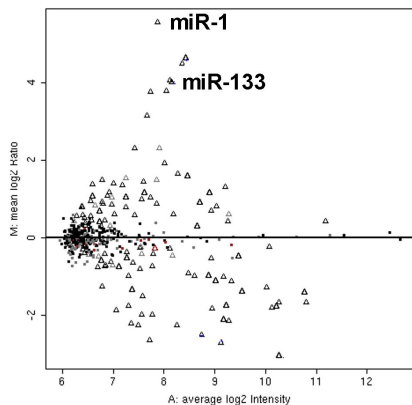
3. 研究の方法

(1) マイクロ RNA による心筋リプログラミング制御機構の解明

心筋細胞特異的に発現するマイクロ RNA の同定

マイクロ RNA による心筋リプログラミング制御機構を解明するため、まず心筋細胞に特異的に発現するマイクロ RNA を同定する。方法としては自ら開発した心筋細胞と心臓線

維芽細胞の FACS による高純度な細胞選別法を用いて (Ieda M, Dev Cell, 2009) 心筋特異的マイクロ RNA の発現をマイクロアレイで解析する。予備実験の結果、既知の miR-1, miR-133 に加えて複数の新規心筋特異的マイクロ RNA を見出した (図 1)。今後アレイの結果および iCM 細胞におけるマイクロ RNA の誘導を qRT-PCR で確認する。



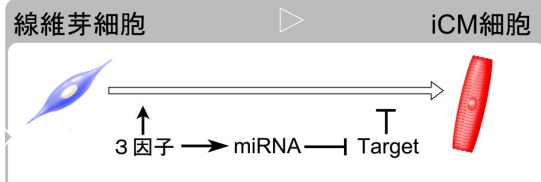
(図 1) マイクロ RNA マイクロアレイ

心筋リプログラミング過程を制御するマイクロ RNA の同定

新規のものも含めて 心筋特異的マイクロ RNA の中から心筋リプログラミング過程を制御するマイクロ RNA を同定する。スクリーニング方法としては α -MHC GFP マウスの心臓線維芽細胞に Gata4/Mef2c/Tbx5 の 3 因子を導入する際に、同時にマイクロ RNA 機能を増強するマイクロ RNA mimic (miR) を導入して心筋誘導効果を α MHC-GFP、cardiac troponin T (cTnT) の心筋マーカーで FACS により定量的に解析する。FACS で iCM 細胞の誘導効率を解析し、心筋リプログラミングを制御するマイクロ RNA を同定する。

マイクロ RNA による心筋リプログラミング制御機構の解明

マイクロ RNA による心筋リプログラミング制御機構を解明するため、まずマイクロ RNA が抑制するターゲット遺伝子を探索する。方法としては TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) などのソフトウェアを用いてターゲット遺伝子を探索し、その後ターゲット遺伝子の 3' -UTR 領域の抑制をルシフェラーゼアッセイで確認する。マイクロ RNA 過剰発現時にターゲット遺伝子の mRNA、蛋白の発現が減少することでターゲット遺伝子と確認できる。最終的にマイクロ RNA によるターゲット遺伝子抑制が心筋リプログラミングに寄与するか確認するため、ターゲット遺伝子のノックダウンでマイクロ RNA による心筋誘導効果を補完できるか検討する。これらの解析よりマイクロ RNA による心筋リプログラミング制御機構を解明できる (図 2)。

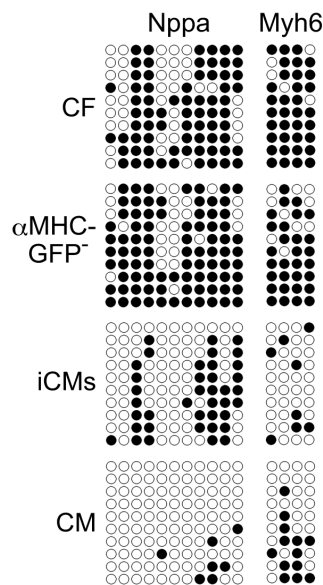


(図 2) マイクロ RNA によるターゲット遺伝子抑制を介した心筋リプログラミング誘導機構

(2) エピジェネティック因子による心筋リプログラミング

心筋リプログラミング過程で誘導されるエピジェネティック因子の同定

心筋リプログラミングにおけるエピジェネティック変化の分子基盤を明らかにするため、リプログラミング過程で誘導されるエピジェネティック因子を同定する。経時的に iCM 細胞の遺伝子発現を解析することで目的のエピジェネティック因子を同定する。方法としては以前作成した心筋細胞のみ GFP を発現する遺伝子改変マウス (α -MHC GFP マウス) を用いて、このマウス心臓線維芽細胞に Gata4, Mef2c, Tbx5 を導入し経時的に GFP 陽性の iCM 細胞を FACS により選別収集する (Ieda M, Cell, 2010)。iCM 細胞の遺伝子発現をマイクロアレイで線維芽細胞、心筋細胞と比較し、リプログラミング過程で誘導されるエピジェネティック因子を同定する。



(図 3) 誘導心筋のエピジェネティック状態は心筋類似である

心筋リプログラミングを誘導するエピジェネティック因子の同定

心筋リプログラミング過程のエピジェネティック変化として iCM 細胞における心筋細胞特異的遺伝子のヒストンメチル化やアセチル化、DNA メチル化状態を検討する。GFP 陽性の iCM 細胞を FACS により選別し、エピジ

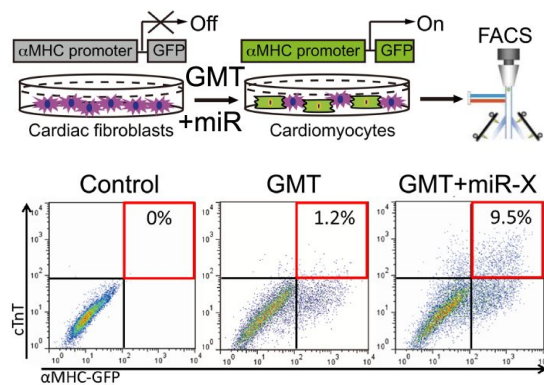
エネティック状態を Chromatin immunoprecipitation 法 (ChIP)、Bisulfite sequencing 法を用いて解析し、線維芽細胞、心筋細胞と比較する。

これまでの実験結果では iCM 細胞は線維芽細胞と比較して心筋特異的遺伝子 (リアノジン受容体、心筋特異的トロポニン T、 α -アクチニン) のヒストンメチル化の抑制マーカー H3K27me3 が低下しており、逆に活性化マーカーである H3K4me3 は上昇していた。また別の心筋特異的遺伝子 (ANP、 α -MHC) で DNA の脱メチル化状態が観察され iCM 細胞において心筋類似のエピジェティック状態が観察された (図 3)。上記エピジェネティック変化を誘導する因子として心筋リプログラミング過程で誘導されるエピジェネティック因子から候補因子を探索する。

4. 研究成果

(1) 心筋直接リプログラミングを促進するマイクロ RNA の同定

我々はこれまでに新規のものも含めた複数の心筋特異的マイクロ RNA の中から心筋リプログラミングを促進するマイクロ RNA を同定した。 α -MHC GFP マウスの心臓線維芽細胞に Gata4/Mef2c/Tbx5 の 3 因子を導入する際に、同時にマイクロ RNA 機能を増強するマイクロ RNA mimic (miR) を導入して FACS により定量的に解析した。これまでの実験で miR の遺伝子導入効率が 90% 以上であること、心筋リプログラミングを促進する心筋特異的マイクロ RNA (miR-X) を同定することに成功した (図 4)。今後スクリーニングを続け、さらに心筋誘導を改善するマイクロ RNA がないか検討する。またマイクロ RNA のみで心筋リプログラミングが可能かも検討する予定である。



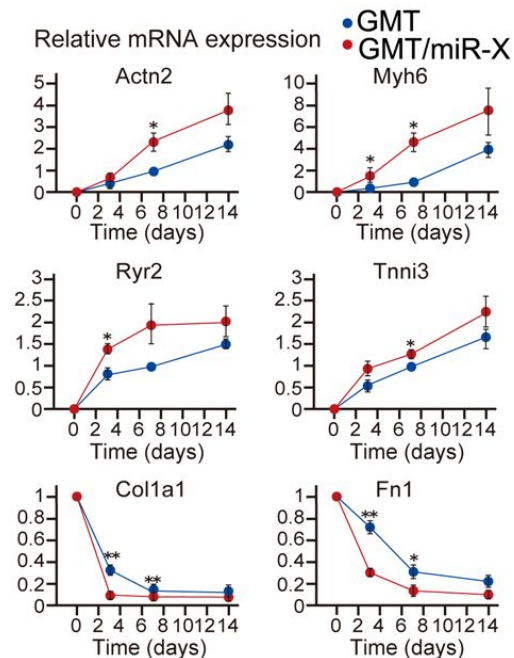
(図 4) 心筋リプログラミングを促進するマイクロ RNA のスクリーニング (上図) と心筋特異的マイクロ RNA (miR-X) による心筋誘導促進。赤枠の MHC-GFP+/cTnT+ 細胞が増加 (下図)

(2) マイクロ RNA により誘導される心筋様細胞の経時的変化

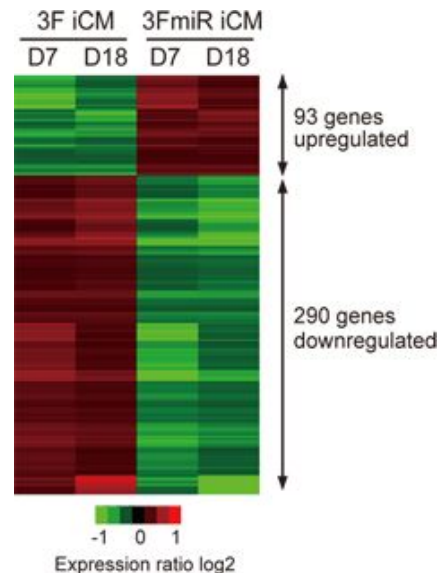
マイクロ RNA による心筋リプログラミング促進効果の分子基盤を明らかにするため、経

時的に誘導心筋細胞の遺伝子発現や生理機能を解析した。これまでの結果では qRT-PCR で miR-X による心筋遺伝子の上昇や線維芽細胞遺伝子の発現低下がリプログラミング早期から認められることを見出した (図 5)。

(図 5) miR による心筋誘導



(3) マイクロ RNA による心筋リプログラミングの分子基盤解明



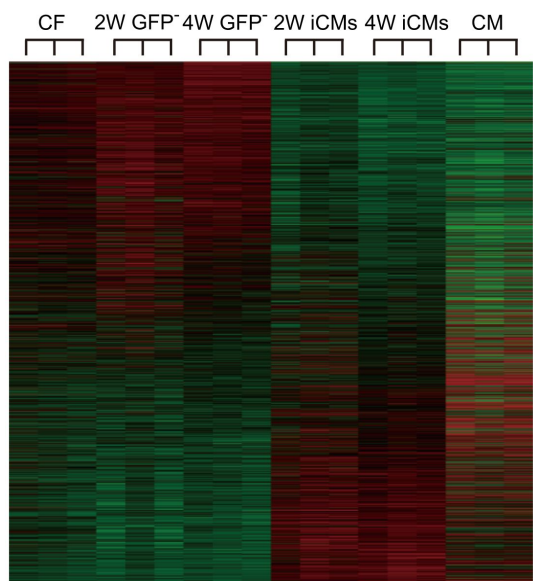
(図 6) マイクロ RNA による遺伝子発現パターンの変化

マイクロ RNA による心筋リプログラミングの制御機構を解明するため、miR-X 導入により発現が変化する遺伝子をマイクロアレイ法で網羅的に解析した。変化した遺伝子群の特徴を GO term 解析、Pathway 解析、Scatter plot 解析などにより検討して、miR-X によりどのような性質をもった遺伝子群が上昇するか、または低下するか検討した結果、miR-X により 93 遺伝子が上昇し、290 遺伝子が低下

することを見出した。さらには Scatter plot 解析の結果、上昇した遺伝子は心筋特異的遺伝子が有意であること、逆に低下した遺伝子は線維芽細胞特異的遺伝子が有意であることを確認した(図6)。この結果は miR-X による心筋リプログラミング促進の機序として、心筋遺伝子群の誘導のみならず、線維芽細胞の表現型を同時に消すことも重要であることを示唆している。

(4) 心筋リプログラミング過程で誘導されるエピジェネティック因子の同定

これまでに心筋誘導 2 週間後と 4 週間後の iCM 細胞を比較したところ、時間経過とともに心筋細胞の機能的成熟を示す遺伝子群の発現が上昇しており(ホスホランパン、Na/Ca Exchanger、心室筋型ミオシン軽鎖 MLC2v など) それとともに複数のエピジェネティック因子も誘導されていることが確認された(図7)。今後その機能的な意義を確認する予定である。



FDR-adj $p < 0.0001$ in at least one comparison

(図7) 誘導心筋のマイクロアレイ解析でエピジェネティック候補因子を同定

(5) 得られた成果のインパクト、展望

以上よりこれまでに心筋リプログラミングを促進する新規マイクロ RNA、その分子基盤を見出した。今後、さらに解析を追加して原著論文として発表する予定である。これまで心筋リプログラミングの分子基盤は不明であり、本論文は世界で初めてリプログラミング分子基盤の一端を明らかにする論文となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

(1) Muraoka N, Ieda M. Direct Reprogramming of Fibroblasts into Myocytes to Reverse Fibrosis. Annu Rev

Physiol. 76:21-37, 2014.

doi:10.1146/annurev-physiol-021113-170301. 査読有

(2) Wada R, Muraoka N, Inagawa K, Yamakawa H, Miyamoto K, Sadahiro T, Umei T, Kaneda R, Suzuki T, Kamiya K, Tohyama S, Yuasa S, Kokaji K, Aeba R, Yozu R, Yamagishi H, Kitamura T, Fukuda K, Ieda M. Induction of Human Cardiomyocyte-like Cells from Fibroblasts by Defined Factors. Proc Natl Acad Sci U S A. 110 (31):12667-72. (2013). doi: 10.1073/pnas.1304053110. 査読有

(3) Qian L, Berry EC, Fu JD, Ieda M, Srivastava D. Reprogramming of mouse fibroblasts into cardiomyocyte-like cells in vitro. Nat Protoc. 8(6):1204-15, (2013). doi: 10.1038/nprot.2013.067. 査読有

(4) Inagawa K, Miyamoto K, Yamakawa H, Muraoka N, Sadahiro T, Umei T, Wada R, Katsumata Y, Kaneda R, Nakade K, Kurihara C, Obata Y, Miyake K, Fukuda K, Ieda M. Induction of Cardiomyocyte-like Cells in Infarct Hearts by Gene Transfer of Gata4, Mef2c, and Tbx5. Circulation research. 111:1147-56, (2012).

doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.271148. 査読有

(5) Srivastava, D., and Ieda, M. Critical factors for cardiac reprogramming. Circulation research. 111:5-8, (2012). doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.271452. 査読有

〔学会発表〕(計 86 件)

(1) Masaki Ieda, "Direct Reprogramming of Fibroblasts into Cardiomyocyte-like Cells in Infarct Hearts" Stem Cell and Regenerative Medicine Global Congress 2013, 2013.3.27-3.29, Seoul, South Korea.

(2) Masaki Ieda, 第 77 回日本循環器学会学術集会 プレナリーセッション, "Direct Conversion of Fibroblasts into Cardiomyocyte-like Cells by Defined Factors", 2013.3.15-3.17, 横浜

(3) 家田真樹, 第 48 回日本小児循環器学会会長特別企画 世紀の発見が医療を変える, "直接リプログラミングによる心筋細胞の作製" 2012.7.5, 京都

(4) Masaki Ieda, American Heart Association Scientific Sessions 2011, Pluripotent Stem Cell Biology, "Direct Reprogramming of Fibroblasts into Functional Cardiomyocytes", 2011.11.12-11.16, Orlando, Florida, USA.

〔図書〕(計 27 件)

(1) 村岡直人, 家田真樹 直接リプログラミング技術を用いた再生医療の展望 最新医学 第 69 巻号 877 号, p562-571, 2014.

(2) Masaki Ieda, CRC Press, Taylor and Francis Group, Induced Cardiomyocytes: Direct reprogramming for cardiac regeneration “ Cardiac Regeneration Using Stem Cells ” USA. p258-275, 2013.

(3) Masaki Ieda, Humana Press, Springer, Cellular Reprogramming and Fate Conversion “ Advances in Stem Cell Research ” USA. p211-225, 2012.

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

報道

朝日新聞、東京新聞、毎日新聞、日本経済新聞、日経産業新聞、産経新聞、読売新聞、日刊工業新聞、中日新聞、TBS ニュース、時事通信、共同通信、日経バイオテク、北海道新聞、河北新報、信濃毎日新聞、静岡新聞、沖縄タイムズ、化学工業日報、西日本新聞、東奥日報、北国新聞、富山新聞、北日本新聞、大阪日日新聞、山陽新聞、日本海新聞、大分合同新聞、宮崎日日新聞、などに関連記事掲載 『ヒトで心筋直接作製』 2013 年 7 月 16 日

朝日新聞、日本経済新聞、読売新聞、産経新聞、日経産業新聞、日刊工業新聞、東京新聞、時事通信社、共同通信社、日経 BP 社、NHK ニュース、ナショナルジオグラフィックニュース、などに関連記事掲載 『移植せずに心筋再生 慶大チーム心臓の細胞に遺伝子入れる方法開発』 2012 年 8 月 29 日

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

家田 真樹 (IEDA, Masaki)

慶應義塾大学・医学部・特任講師

研究者番号：70296557