

令和元年6月2日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09147

研究課題名(和文) iPSを介さない直接誘導による心臓ペースメーカー細胞の作成および生体内直接転化

研究課題名(英文) The making of the pacemaker cell by the direct cardiac reprogramming and in vivo transformation

研究代表者

山川 裕之 (YAMAKAWA, Hiroyuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・客員講師

研究者番号：80465020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生体内のリプログラミングでは、共同研究でのMiyamotoらは、3つの心筋誘導遺伝子を同時に発現するセンダイウイルスベクターを開発した。この心筋誘導センダイウイルスベクターを用いて、培養皿上で、効率よく短期間でマウスおよびヒト線維芽細胞から心筋細胞をゲノムの損傷なく、直接的に作製することに成功した。さらに心筋誘導センダイウイルスベクターをマウス心筋梗塞モデルの心臓に導入すると、1週間で心筋再生が始まり、1か月後には心機能が改善することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

宮本らの研究で、センダイウイルスを使用することで実現できることは示唆できた。この成果は、iPS細胞から誘導した心筋治療以外の新しい治療法を示唆できた。この成果は、社会的に大きいと考える。さらに、心筋細胞は、色々な細胞が存在している。具体的には、右心室、左心室、ペースメーカー細胞などがあり、更に分化した心筋細胞での直接心筋誘導の研究を進める必要がある。

研究成果の概要(英文)：By the in vivo reprogramming, Miyamoto et al, who was our collaborators, developed the Sendai virus vector which developed three cardiac-specific genes at the same time. Using these cardiac reprogramming Sendai virus vectors, We succeeded in making cardiac-like cells (induced cardiomyocytes: iCMs) without the genomic damage from a mouse and a human fibroblast directly efficiently in a short term on a culture dish. Furthermore, iCM reproduction began in one week when I introduced cardiomyocytes instruction Sendai virus vector into the heart of the mouse myocardial infarction model and confirmed that cardiac function was improved one month later.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 心筋直接誘導 ダイレクトリプログラミング

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

世界保健機関 (WHO) が発表した心疾患による年間死亡数は、生活習慣病の中で1位である。さらに、2030年には2500万人に増加すると予測される。重症拡張型心筋症の患者は、心筋細胞が広範囲に障害を受けると、心筋細胞が線維芽細胞に置換され、心臓の収縮能力が低下してしまう。根本的な治療は、心臓移植や人工心臓などが必須であるが、近年はドナー不足や合併症などの課題が散見される。近年、ES/iPS細胞が注目されてきており、心臓の収縮能力を改善するために、心筋再生医療が次世代の究極的な治療のひとつとして注目されている。

2. 研究の目的

我々は iPS 細胞を介さず、線維芽細胞から直接心筋細胞 (Induced Cardiomyocyte: iCM と略す) を誘導する画期的な方法を発見し、全世界で初めて報告をした (Ieda M et al. Cell, 2010)。心臓発生に重要な3つの心筋特異的転写因子 (Gata4, Mef2c, Tbx5:以降 GMT と略す) を遺伝子導入し、iPS 細胞を介さずに約20%の線維芽細胞が直接心筋様細胞に転換する事を確認した。しかし、線維芽細胞から誘導心筋細胞 (iCM 細胞) への誘導は20%程度であり、さらに収縮能力を有する iCM 細胞は約1%も満たさず、心筋再生のためには十分な細胞数が得られない (図1)。本研究では2万個もあるというヒトの転写因子から、網羅的にスクリーニングを行い心筋成熟転写因子を定める手法を構築する。その転写因子の中から、新たな心筋誘導転写因子 (Z 因子と名付ける) の候補を特定し、重症心不全モデルマウスに注入することで心機能改善することを目的とする。

本研究の礎となった Ieda らの研究は、心臓に内在する線維芽細胞から直接誘導し心臓再生するという新しい概念を打ち立てた。この研究成果は、既存の心筋再生が抱える問題を一举に解決する画期的なものであった (Ieda M et al. Cell, 2010)。この概念は本研究室の独創的なものであり、全世界の再生医療および循環器内科学会にて注目されている。

2010年に Ieda らが発表してから、世界中で色々な報告がされている。著名な研究室である Olson 研究室、Srivastava 研究室から (Nature, 2012 など)、相次いで報告された。2013年に当研究室の Wada らに、ヒト線維芽細胞から iCM を作成したことを報告した (Wada R, Yamakawa H et al. PNAS, 2013)。このように心臓再生医療の実現のため、本研究を含め全世界で心筋直接リプログラミング研究の激しさが増している。この重症心不全モデルマウスに対する iCM 細胞のリプログラミング技術が確立すれば、ヒトへの応用も可能である。よって、重症心不全患者における再生医療の新たな可能性が期待できる。

3. 研究の方法

我々は、本研究の目的を成功させるために、今までの基礎研究の結果を踏まえ、2つの課題へ還元することが出来る。

- (1) 新規の心筋成熟転写因子の同定と、直接誘導による心筋細胞の機能評価
- (2) 心不全モデルマウスにおける、生体内での直接リプログラミングによる心筋誘導

これまでの研究成果として、我々は2万個もあるというヒトの転写因子から、網羅的にスクリーニングを行い、拍動を有するように心筋を成熟させるような「心筋成熟誘導転写因子」の候補を同定した。

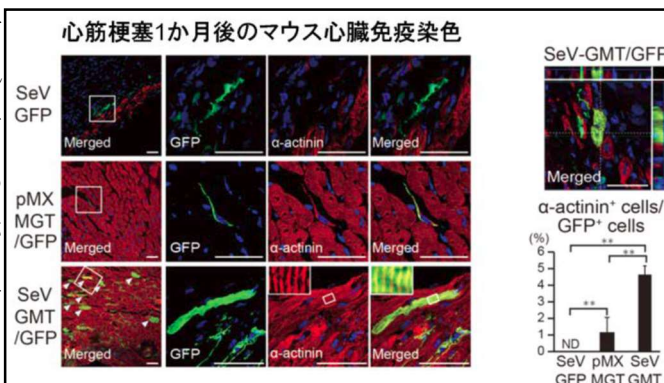
具体的には、心筋細胞に強発現しているが、誘導心筋細胞（iCM細胞）や線維芽細胞で弱発現の転写関連遺伝子を、アレイデータから網羅的に検索し1221個の転写因子を抽出した。産業技術総合研究所バイオメディカル情報研究センター 五島直樹主任研究員の研究グループとの共同研究を行い、120個の新規心筋誘導転写因子の候補プラスミド提供を受け、「心臓ペースメーカー誘導転写因子」スクリーニングを行った。

4. 研究成果

(1) センダイウイルスによる、マウス生体内での心筋直接誘導による心筋細胞の機能評価

マウス生体内の心臓線維芽細胞に3つの心筋誘導遺伝子を、レトロウイルスベクターを用いて導入し、マウス生体内で直接的に心筋細胞を作製できることを報告してきた。しかし、これまでの方法では、①心筋誘導の際に、ウイルスによって3つの遺伝子が組み込まれるために、細胞のゲノムを損傷する可能性がある、②心筋誘導効率が低く、心筋作製に長期間かかるという課題があった。

この研究で、3つの心筋誘導遺伝子を同時に発現するセンダイウイルスベクター

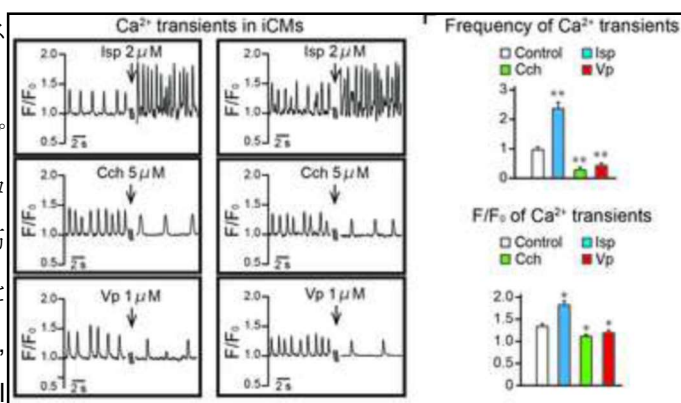


(図1) 心筋誘導センダイウイルスベクター (SeV-GMT/GFP)により生体内で心筋誘導効率が改善したら

(以下、心筋誘導センダイウイルスベクター)を開発した。この心筋誘導センダイウイルスベクターを用いて、培養皿上で、効率よく短期間でマウスおよびヒト線維芽細胞から心筋細胞をゲノムの損傷なく、直接的に作製することに成功した。さらに心筋誘導センダイウイルスベクターをマウス心筋梗塞モデルの心臓に導入すると、1週間で心筋再生が始まり、1か月後には心機能が改善することを確認した(図1)(Miyamoto K, Yamakawa H, Ieda M et al, Cell Stem Cell, 2018)。

(2) センダイウイルスにおける、心筋直接誘導による心筋細胞の機能解析

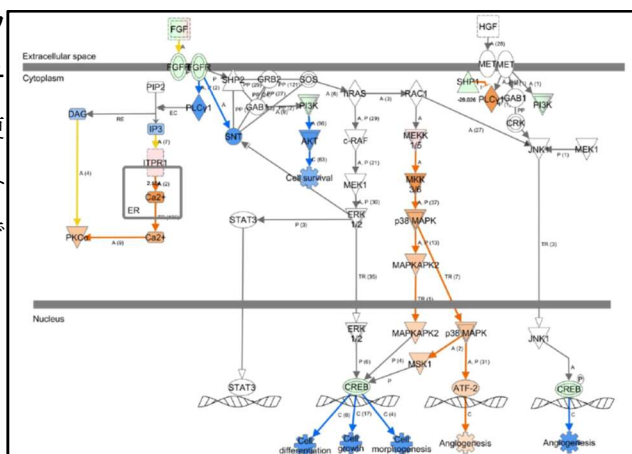
同研究室にて、センダイウイルスによる誘導心筋細胞(iCM細胞)で、Ca²⁺イメージングをおこなった。イソプロテノール(Isp)負荷及び、バルプロン酸(Vp)負荷にて、通常の単離心筋細胞と同様の所見が得られていることが分かった(図2)(Miyamoto K, Yamakawa H, Ieda M et al, Cell Stem Cell, 2018)。



(図2) 心筋誘導センダイウイルスベクター (SeV-GMT/GFP)は、通常の心筋細胞と同様の反応を示した

(3) 心不全モデルマウスにおける、生体内での直接リプログラミングによる心筋誘導

現在、モデルマウスで施行する前に、通常のマウスでの Z 因子 + GMT 遺伝子導入するためのベクターを選定している。そこで、最適なベクターが確定すれば、Z 因子 + GMT 遺伝子導入を行うことが可能となる。今後、心筋梗塞モデルマウスや、心不全モデルマウスへ最適なベクターで遺伝子導入を行う予定である。(図 3)



(図 3) Z 因子が影響が及ぶパスウェイ解析

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Muraoka N, Nara K, Tamura F, Kojima H, Yamakawa H, Sadahiro T, Miyamoto K, Isomi M, Haginiwa S, Tani H1, Kurotsu S, Osakabe R, Torii S, Shimizu S, Okano H, Sugimoto Y, Fukuda K, Ieda M. Role of cyclooxygenase-2-mediated prostaglandin E2-prostaglandin E receptor 4 signaling in cardiac reprogramming. *Nat Commun.* ;10(1):674, 2019 (査読あり)
2. Miyamoto K, Akiyama M, Tamura F, Isomi M, Yamakawa H, Sadahiro T, Muraoka N, Kojima H, Haginiwa S, Kurotsu S, Tani H, Wang L, Qian L, Inoue M, Ide Y, Kurokawa J, Yamamoto T, Seki T, Aeba R, Yamagishi H, Fukuda K, Ieda M. Direct In Vivo Reprogramming with Sendai Virus Vectors Improves Cardiac Function after Myocardial Infarction. *Cell Stem Cell.* 2018 22(1):91-103.e5.(査読あり)
3. Umei TC, Yamakawa H, Muraoka N, Sadahiro T, Isomi M, Haginiwa S, Kojima H, Kurotsu S, Tamura F, Osakabe R, Tani H, Nara K, Miyoshi H, Fukuda K, Ieda M. Single-Construct Polycistronic Doxycycline-Inducible Vectors Improve Direct Cardiac Reprogramming and Can Be Used to Identify the Critical Timing of Transgene Expression. *Internal Journal Moleluar Science.* 18(8). E1805, 2017. (査読あり)
4. Yamakawa H Heart regeneration for clinical application update 2016: from induced pluripotent stem cells to direct cardiac reprogramming. *Inflammation and Regeneration.* 36:23. 2016 (査読あり)
5. Yamakawa H, Muraoka N, Miyamoto K, Sadahiro T, Isomi M, Haginiwa S, Kojima H, Umei T, Akiyama M, Kuishi Y, Kurokawa J, Furukawa T, Fukuda K, Ieda M. Fibroblast Growth Factors and Vascular Endothelial Growth Factor Promote Cardiac Reprogramming under Defined Conditions. *Stem Cell Reports.* 5(6):1128-42, 2015. (査読あり)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 1 件)

1. 山川裕之、家田真樹 実験医学増刊 Vol.37 No.5 心不全のサイエンス 治療法開発をめざ

〔産業財産権〕

特になし

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。