

令和元年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19426

研究課題名(和文) 心臓前駆細胞誘導転写因子の同定と多能性幹細胞からの心筋誘導

研究課題名(英文) Discovery of master regulator of cardiac progenitor cells for PSC differentiation into CMs

研究代表者

貞廣 威太郎 (Sadahiro, Taketaro)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：60571130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：多能性幹細胞から心筋細胞の分化法は、複数の液性因子を使用し、心臓前駆細胞をへて心筋細胞に分化させることが一般的である。しかし、この方法には、工程が煩雑・不安定、液性因子が高価、という課題がある。分化の分子機構は明らかにされておらず、分化を誘導する転写因子を同定することにより、遺伝子の発現のみで多能性幹細胞から心臓前駆細胞の分化が可能になると考えた。ダイレクトリプログラミングを応用し線維芽細胞から心臓前駆細胞を誘導するTbx6遺伝子を発見し、Tbx6遺伝子をマウスES細胞あるいはヒトiPS細胞といった幹細胞に導入することにより、液性因子を使用せずに心臓前駆細胞の分化が可能であることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Tbx6をマウスES細胞・ヒトiPS細胞に導入することにより、液性因子を使用せずに効率よく増殖可能な心臓前駆細胞を作製し、さらにこれを心筋細胞や血管細胞を誘導することに成功し、液性因子を使用しない新たな心筋・血管細胞作製法を開発した。本研究で開発した手法は、その誘導効率が従来の液性因子を使用した誘導法よりも優れていただけでなく、高額な液性因子を使用しないため、心筋誘導法における問題点であったコストを約80%削減でき、再生医療や心筋細胞作製に大きく貢献すると予想される。

研究成果の概要(英文)：Cardiac progenitor cell(CPC) arises from pluripotent stem cells and differentiates into cardiomyocytes. However, the molecular mechanisms underlying this process remain unclear. Here we show Tbx6 induces CPCs from pluripotent stem cells (PSCs) and determines cardiovascular lineage specification via its temporal expression. Direct reprogramming-based screening identified Tbx6 was a CPC-inducing factor. Thus, Tbx6 is critical for CPC induction and subsequent lineage diversification.

研究分野：循環器内科

キーワード：心臓再生 ダイレクトリプログラミング 線維芽細胞 多能性幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

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、心臓は障害を受けると心機能が低下して心不全に至る。これに対して 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、活発に研究が行われている。これまでの研究で幹細胞から心筋細胞に分化する際は、中胚葉由来の心臓前駆細胞を経由することわかってきた。心臓前駆細胞の特徴としては自己複製能を有し、高い心筋分化能を示すことが挙げられ、この細胞は血管内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞など心臓内のすべての細胞に分化することが運命づけられている。以上の知見より、幹細胞から心臓前駆細胞を選択的に分化誘導できれば高効率で心筋細胞や心臓構成細胞が得られ、再生医療に活用できる可能性がある。

近年、多能性幹細胞から心臓前駆細胞・心筋細胞を誘導する方法として、発生初期の心臓前駆細胞誘導に重要な液性因子である Activin/ Nodal, BMP などのサイトカインやシグナル阻害薬を用いる方法が報告されている。しかしながら、サイトカインによる心筋誘導法は幹細胞のライン間で誘導効率に差があり、さらに液性因子の微細な濃度調節や頻回の培地交換が必要など、心筋作製工程が不安定かつ煩雑であるという課題がある(Steven J. Kattman et al, *Cell Stem Cell*, 2011)。また、心臓前駆細胞を誘導する液性因子の細胞内シグナル伝達系や転写因子ネットワークなどの分子機構、さらに心臓前駆細胞誘導因子(マスター因子)はこれまで同定されていない。もし液性因子を使用せずに、転写因子のみで多能性幹細胞から選択的に心臓前駆細胞や心筋細胞の誘導(プログラミング)が可能となれば、安定かつ簡便、さらに安価に心筋細胞の作製が可能となり、心臓再生医療の実現を画期的に前進させることが期待できる。われわれの研究室ではこれまでに転写因子を用いた細胞分化誘導の研究を行っており、線維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いて転写因子を導入して直接心筋を作製する心筋ダイレクトリプログラミング法を開発してきた。これまでに 14 の転写因子をスクリーニングし、Gata4、Mef2c、Tbx5 の 3 つの心筋特異的転写因子を同時に導入することにより線維芽細胞から iPS 細胞を経ずに直接心筋細胞(iCM 細胞)に短期間でリプログラミングできることを世界で初めて示した(Ieda et al, *Cell* 2010, Inagawa et al, *Circ Res* 2012, Wada et al, 2013 *PNAS*, Muraoka et al, *EMBO J* 2014)。しかしこれまで心臓前駆細胞を直接誘導できる転写因子は同定されていない。我々は、この線維芽細胞への遺伝子導入によるスクリーニング法は、幹細胞への遺伝子導入と比較して簡便かつ短期間で実施可能であり、細胞の運命決定因子であるマスター因子同定に有力な方法と考えた。このスクリーニングで得られる心臓前駆細胞誘導因子をマウス ES 細胞やヒト iPS 細胞に Tet-On レンチウイルス system で導入して、ドキシサイクリンの添加のみで転写因子の発現を自由自在に制御できる系を確立し、この細胞を用いて転写因子の発現制御のみで心臓前駆細胞や心筋細胞が誘導可能か検討することとした。

2. 研究の目的

本研究では、ダイレクトリプログラミングの手法を用いて 60 の転写因子をスクリーニングして、新規の心臓前駆細胞誘導因子(マスター因子 A)を同定する。さらに転写因子 A によりマウス ES 細胞から心臓前駆細胞や心筋細胞を誘導する系を確立して、心臓前駆細胞誘導の分子メカニズムや転写因子ネットワークを明らかにする。さらに、ヒト ES/iPS 細胞から心筋細胞を誘導する系を同様の手法で確立して心臓再生への応用を目指す。

これまでに無血清培養条件で単一遺伝子により心臓前駆細胞や心筋細胞を幹細胞から誘導できたという報告は存在しない。本研究により転写因子発現のみで心臓前駆細胞や心筋細胞が誘導できれば、高価な液性因子や煩雑な工程を経ずに効率的に心筋細胞作製が可能となり、再生医療のみならず、創薬やドラッグスクリーニング、循環器疾患モデルの開発など、多くの応用が可能となる。

3. 研究の方法

- (1) 心臓前駆細胞プログラミング因子の選定
- (2) 選定した因子 A を T-GFP マウス ES 細胞に導入し、無血清培地で心臓前駆細胞・心筋細胞誘導をドキシサイクリンシステムで行う。
- (3) 誘導した心臓前駆細胞の分子機序や転写制御ネットワーク解析。
- (4) ヒト iPS 細胞で同様の実験を行ない、異なった種で保存された心筋誘導システムか検討。

4. 研究成果

(1) 新規心臓前駆細胞誘導因子 Tbx6 を発見

幹細胞への遺伝子導入と比較して、容易かつ短期間で遺伝子導入が可能線維芽細胞を用いてスクリーニングを行い、線維芽細胞から心臓前駆細胞をリプログラミングできる因子を同定することとした。ES 細胞から分化させた心臓前駆細胞のマイクロアレイデータを用いて、同時期特異的に発現する転写因子であり、ノックアウトマウスで心臓の発生異常・胎生致死の表現型を示す 58 個の遺伝子を候補として選定した。そして産総研が所有する世界最多の cDNA ライブラリーを用いて、候補因子が導入された 58 種類のレトロウイルスベクターをマウス胎児線維芽細胞に個別に感染させ、遺伝子の過剰発現のみで心臓前駆細胞が誘導できるかを検討した。遺伝子導入 7 日後に心臓前駆細胞特異的に発現する転写因子である Mesp1 の mRNA 発現を解析し

たところ、Tbx6 を導入した線維芽細胞でのみ Mesp1 発現が誘導されている事が明らかとなった

(2) マウス初期中胚葉において Tbx6 発現細胞は心臓関連遺伝子を共発現していた

胎生 7.0-7.75 日のマウス生体内中胚葉細胞の single cell-RNA seq データを用いて Tbx6 発現細胞の局在を解析したところ、Tbx6 は胎生 7.0 日の初期中胚葉に発現していた。さらに、この Tbx6 発現細胞が初期中胚葉遺伝子 (T, Mixl1, Mesp1) だけでなく、心臓の原器である心臓中胚葉や、より心臓にむけて分化した初期心臓前駆細胞遺伝子 (Flk1, Pdgfr α , Isl1, Gata4) を発現していることが判明した。

(3) 多能性幹細胞からの心臓中胚葉・心筋分化の過程に Tbx6 が関与していた

マウス ES 細胞から心筋細胞への分化誘導における遺伝子の発現パターンを解析した。中胚葉遺伝子である T が発現すると GFP を発現する TGFP/+ ES 細胞を用いて、液性因子により ES 細胞から心筋細胞へと分化させたところ、Tbx6 が他の心臓中胚葉遺伝子発現と同時期に GFP 陽性の中胚葉細胞に限局して一過性に発現している事を確認した。Tbx6 の心血管系分化への寄与を評価する目的で、CRISPR-Cas9 により Tbx6 をノックアウトした ES 細胞を作製した。同様の誘導法を用いて心筋に分化させたところ、Tbx6 ノックアウト ES 細胞では中胚葉・心臓中胚葉誘導が抑制され、心筋誘導効率は 1/3 程度に著明に抑制された。以上の結果から、多能性幹細胞からの心筋分化誘導過程においても Tbx6 が心筋分化に重要な役割をもつ遺伝子であることが明らかとなった。

(4) 一過性の Tbx6 発現により液性因子を使用せずに心臓前駆細胞が誘導された

Tbx6 を Tet-On レンチウイルスシステムでマウス ES 細胞に導入し、Tbx6 遺伝子発現を自由に制御できる系を確立した。この系を用いて液性因子を使用せずに Tbx6 遺伝子発現のみで心臓中胚葉・心臓前駆細胞の誘導が可能であるかの検討を行った。検討の結果、Tbx6 発現がない場合は、心臓中胚葉が全く誘導されない一方で、誘導開始後 3 日間の Tbx6 発現により液性因子を使用せず、約 88% の ES 細胞が中胚葉細胞に誘導され、この中胚葉の 37.5% が Flk-1+/ PDGFR α + の心臓中胚葉であった。その後、心臓前駆細胞を経て、約 67% の細胞が心筋に誘導され、その効率は液性因子による心筋誘導効率よりも良好であった。また培養条件の変更により、誘導した心臓中胚葉・心臓前駆細胞から平滑筋・血管内皮細胞など、全ての心臓構成細胞への分化が確認された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Muraoka N, Nara K, Tamura F, Kojima H, Yamakawa H, Sadahiro T, Miyamoto K, Isomi M, Haginiwa S, Tani H, Kurotsu S, Osakabe R, Torii S, Shimizu S, Okano H, Sugimoto Y, Fukuda K, Ieda M. Role of Cyclooxygenase-2/Prostaglandin E2/Prostaglandin E Receptor 4 Signaling in Cardiac Reprogramming. *Nature Communications*. ;10(1):674; 2019, Feb 20.

2. Isomi M, Sadahiro T, Ieda M.
Progress and Challenge of Cardiac Regeneration to Treat Heart Failure.
J Cardiol. ; S0914-5087(18)30287-9; 2018, Nov 9.

3. Tani H, Sadahiro T, Ieda M.
Direct Cardiac Reprogramming: A Novel Approach for Heart Regeneration.
Int J Mol Sci. ;19(9). pii: E2629; 2018, Sep 5.

4. Sadahiro T, Isomi M, Muraoka N, Kojima H, Haginiwa S, Kurotsu S, Tamura F, Tani H, Tohyama S, Fujita J, Miyoshi H, Kawamura Y, Goshima N, Iwasaki YW, Murano K, Saito K, Oda M, Andersen P, Kwon C, Uosaki H, Nishizono H, Fukuda K, Ieda M.
Tbx6 Induces Nascent Mesoderm from Pluripotent Stem Cells and Temporally Controls Cardiac versus Somite Lineage Diversification.
Cell Stem Cell. ; 23(3): 382-395. e5; 2018, Sep 6.

5. Shiraishi Y, Katsumata Y, Sadahiro T, Azuma K, Akita K, Isobe S, Yashima F, Miyamoto K, Nishiyama T, Tamura Y, Kimura T, Nishiyama N, Aizawa Y, Fukuda K, Takatsuki S.
Real-Time Analysis of the Heart Rate Variability during Incremental Exercise for the Detection of the Ventilatory Threshold. *Journal of the American Heart Association*. ; 7(1). pii: e006612; 2018, Jan 7.

6. 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*. ; 22(1):91-103. e5; 2018, Jan 4.

〔学会発表〕（計 6 件）

1. Taketaro Sadahiro, Mari Isomi, Naoto Muraoka, Hidenori Kojima, Sho Haginiwa, Shota Kurotsu, Fumiya Tamura, Hidenori Tani, Shugo Tohyama, Kazutaka Miyamoto, Hiroyuki Yamakawa, Keiichi Fukuda, Masaki Ieda “Tbx6 is Critical for Mesoderm Induction and Specification Into Cardiovascular and Somite Lineages”, American Heart Association Scientific Sessions 2017, 2017.11.11-15 Anaheim, California USA.

2. Taketaro Sadahiro, Mari Isomi, Naoto Muraoka, Hidenori Kojima, Sho Haginiwa, Shota Kurotsu, Fumiya Tamura, Hidenori Tani, Shugo Tohyama, Naoki Goshima, Hiroyuki Miyoshi, Hideki Uosaki, Keiichi Fukuda, and Masaki Ieda “Tbx6 is Critical for Cardiac Mesoderm Induction and Lineage Specification Into Cardiovascular and Somite Lineages in Pluripotent Stem Cells”, American Heart Association Scientific Sessions 2018, **2018. 11. 10-14** Chicago, Illinois USA.

〔図書〕（計 1 件） 査読なし

1. 眞廣威太郎, 家田真樹. 心筋細胞分化誘導における心臓再生. 医学のあゆみ (心不全のすべて), Vol266 (2018) No. 13 p. 1248-1253

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

※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。