

令和元年6月2日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19428

研究課題名(和文) センダイウイルスによる効率的な心筋直接誘導法の確立と分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Rapid and Efficient Cardiac Direct Reprogramming using Sendai Virus Vectors

研究代表者

宮本 和享 (MIYAMOTO, KAZUTAKA)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：10528714

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)：本研究で、我々は宿主遺伝子を改変しない心筋誘導センダイウイルスベクターを新たに開発し心筋誘導を行ったところ心筋作製効率は約10%と従来法の100倍に改善し、さらに拍動する心筋細胞を約10日間で作成することができた。次にマウス心筋梗塞モデルで3つの心筋誘導遺伝子をセンダイウイルスベクターでマウス心臓内に導入したところ心筋誘導効率が約1.5%に上昇した。さらに心筋誘導センダイウイルスベクターによる治療群では、無治療群と比較して、1か月後の心臓のポンプ機能が改善した。上記に示した本研究の成果を国際科学雑誌に発表した(Miyamoto et al., Cell Stem Cell 2017)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在全世界において心臓疾患関連死は増加の一途をたどっており、新たな治療法の開発が望まれている。近年、iPS細胞をはじめとした再生医療は様々な領域において実用化に向けた検討がなされている。心疾患の分野においてもその臨床応用が開始されているが、依然として細胞の生着率の問題や安全性の面において克服すべき課題は多い。その点において、本方法が臨床応用された場合上記のような問題点が一気に解消される可能性があり、学術および社会的な意義は高いと考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we show that Sendai virus (SeV) vectors expressing cardiac reprogramming factors efficiently and rapidly reprogram both mouse and human fibroblasts into integration-free iCMs via robust transgene expression. SeV-GMT generated 100-fold more beating iCMs than retroviral-GMT and shortened the duration to induce beating cells from 30 to 10 days in mouse fibroblasts. In vivo lineage tracing revealed that the gene transfer of SeV-GMT was more efficient than retroviral-GMT in reprogramming resident cardiac fibroblasts into iCMs in mouse infarct hearts. Moreover, SeV-GMT improved cardiac function and reduced fibrosis after myocardial infarction. Thus, efficient, non-integrating SeV vectors may serve as a powerful system for cardiac regeneration. Finally, we reported these result on one of authoritative scientific journals (Miyamoto et al., Cell Stem Cell 2017).

研究分野：心筋再生

キーワード：心筋再生 direct reprogramming センダイウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心筋は終末分化細胞であり再生能力を有しないため、一度障害を受けると心臓線維芽細胞の増殖・癒痕化が引き起こされ、結果として心機能が低下する。我々は線維芽細胞に心筋細胞特異的な3つの転写因子を遺伝子導入することで、iPS細胞を経由せず直接心筋細胞(induced cardiomyocyte)を作成することに成功したが(Ieda et al., Cell, 2010)、本方法は遺伝子導入にレトロウイルスベクターを使用するため宿主DNAに外来遺伝子がintegrationされるという問題点があった。そこで本研究では、non-integrationベクターであるセンダイウイルスベクターを用い、安全かつ高効率の心筋リプログラミング法を確立し、誘導された拍動心筋細胞の機能解析を行う。また臨床応用を踏まえ、生体内における心筋誘導の確立を目指す。

2. 研究の目的

心臓はもっとも再生困難な臓器であり、心筋細胞は終末分化細胞であり再生機能に乏しく、心臓障害後は線維芽細胞の増殖により癒痕化し心機能が低下する(Ieda et al, Dev Cell, 2009)。そこで心筋再生医療は心臓病に対する未来の治療として期待されており世界中で活発に研究が行われている。2006年、マウスの体細胞に4種類の遺伝子(山中4因子:Oct4,sox2,klf4,c-myc)を導入することにより、ES細胞と同様の多分化能(pluripotency)と自己複製能を併せ持つ人工多能性幹細胞(iPS細胞:induced pluripotent stem cells)が報告された。しかし幹細胞使用に伴う腫瘍形成の可能性、心筋分化誘導効率の安定化とコストの問題、細胞生着の問題など、依然として克服すべき課題が残っている。

これに対して我々は、心臓内に存在する心臓線維芽細胞を生体内において直接心筋細胞へ分化転換(直接リプログラミング)することが可能になれば、これらの問題点を一気に解決する新しい心臓再生法になると考え、心筋特異的に発現する3つの心筋特異的転写因子(Gata4, Mef2c, Tbx5 以下GMT)を線維芽細胞に導入することで心筋への直接リプログラミングに成功した(Ieda M, Cell 2010)。これによりiPS細胞を介することなく心臓線維芽細胞を心筋様細胞(ICM細胞 Induced Cardiomyocytes)に直接誘導することが可能となった。しかし心筋誘導効率は未だ改善の余地があり、またウイルスベクターとしてレトロウイルスを使用しているため導入遺伝子が宿主遺伝子にintegrateされるといった、挿入変異のリスクなど安全面で課題が存在する。これに対してセンダイウイルスは分裂、非分裂細胞を問わず、哺乳類の多くの細胞種、組織に遺伝子を導入可能であり、高い外来遺伝子の発現能を有する。またゲノムはRNAからできておりDNAとは物質的に異なるため、センダイウイルスが核内の染色体を改変するリスクは原理上なく、挿入変異や染色体の構造変化の危険性もない等、機能性、安全性の両面で有利な特徴を有している(図1,2)。

本研究を開始するにおいて

1. センダイウイルスベクターを用いて心筋特異的転写因子を遺伝子導入することで心筋再生が可能かどうか
 2. 臨床応用に向けて真に安全な心筋誘導を効率的に行うことが可能かどうか
- 以上2点を本研究目的と考える。



図 1.レトロウイルスを用いた遺伝子導入

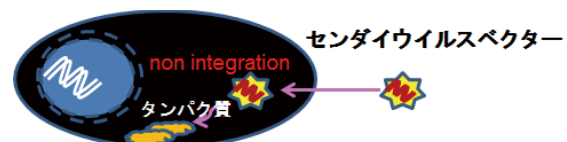


図 2.センダイウイルスを用いた遺伝子導入

3. 研究の方法

(1) センダイウイルスベクターを用いたマウス線維芽細胞からの安全かつ効率的な心筋直接誘導法の確立

これまでの予備実験で、心筋特異的 3 因子をポリシストロニックに発現するセンダイウイルスベクター (SeV-GMT) を作製することに成功し、線維芽細胞にセンダイウイルスベクターを遺伝子導入することによりレトロウイルス(pMX)を用いた方法と比較して、心筋プログラミング効率が顕著に改善することを Facs および免疫染色で確認した(図 3)。

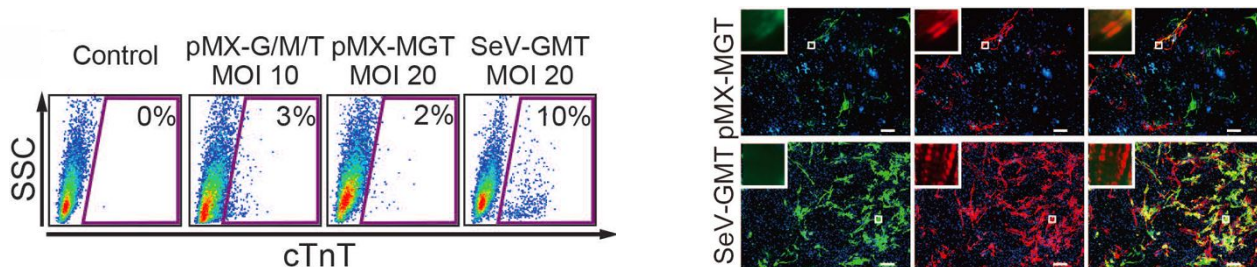
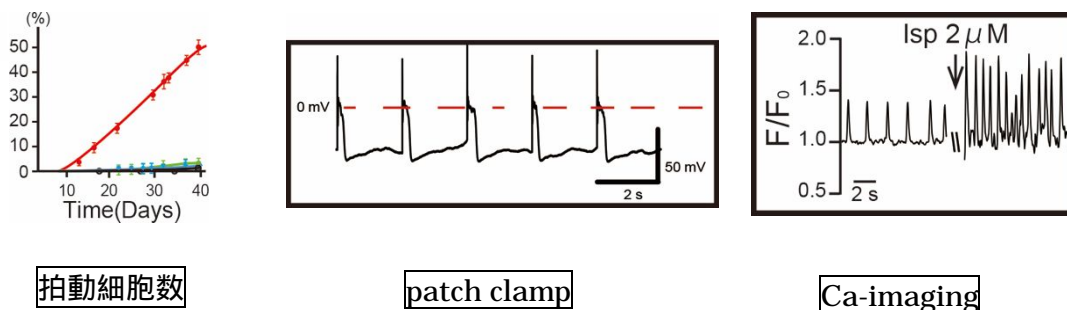


図 3. センダイウイルスベクターを用いることで心筋誘導効率が改善

また誘導された心筋細胞は機能面においても心筋細胞に類似した性質を有していることを拍動心筋細胞数の測定、また patch clamp, Ca-imaging によって確認した(図 4)。



拍動細胞数

patch clamp

Ca-imaging

図 4. センダイウイルスによる誘導心筋細胞は機能面においても心筋細胞類似である

引き続き生体内における心筋直接誘導の可能性について検証するため、センダイウイルスベクターをマウス心筋梗塞部に直接注入したところ、生体内における誘導心筋の作製および心機能の改善が認められた(図 5)。

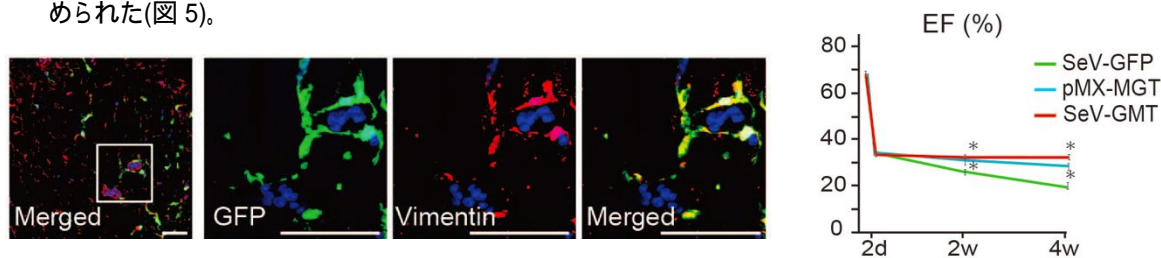


図 5. センダイウイルスベクターによる生体内での心筋直接誘導

今後は臨床応用に向けて誘導心筋細胞のさらなる機能解析を進めるとともに、生体内において長期間の心筋再生が可能かどうかについて検討する必要があると考える。

(2) センダイウイルスベクターを用いたヒト線維芽細胞からの安全かつ効率的な心筋直接誘導法の確立

研究代表者はマウスにおける実験結果およびこれまでの報告を踏まえ検討した結果、ヒト心臓線維芽細胞からセンダイウイルスを用いた心筋直接誘導に成功し、また誘導心筋細胞の機能面における性質についても確認した(図 6, 7)。

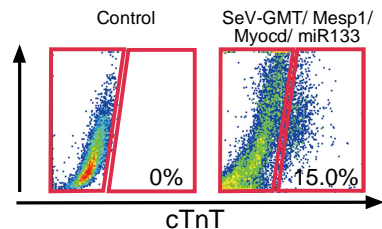
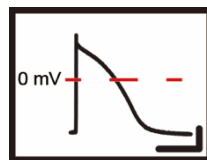
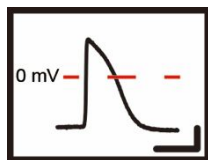


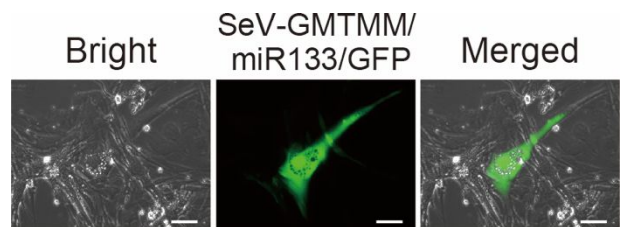
図 6. センダイウイルスによるヒト心筋誘導に成功

心房筋類似 iCM 細胞 心室筋類似 iCM 細胞



patch clamp

20 mV
0.2 s



共培養による拍動誘導心筋細胞

図 7. センダイウイルスによるヒト誘導心筋細胞は機能面においても心筋細胞類似である

今後はさらに誘導効率の改善を目指すとともに、共培養を必要としない拍動心筋細胞の誘導について検討を重ねる予定である。

4. 研究成果

これまで多数の学会において成果発表を行ってきた。日本循環器学会では 2014 年から 2018 年まで発表の機会を得ることができ(Tokyo, March 2014, Osaka, April 2015, Sendai, March 2016, Kanazawa, March 2017)、2018 年は Futured Research Session にて口頭発表を行った(Miyamoto K et al. “Sendai Virus Vectors Achieve Mouse and Human Efficient Integration-Free Cardiac Reprogramming In Vitro and In Vivo.” Osaka, March 2018)。再生医療学会において 2015 年、口頭発表を行った(Miyamoto K et al. Yokohama, March 2015)。また学会賞としては 2014 年に日本心不全学会 Young Investigator’s Award 優秀賞 (Miyamoto K et al. “Direct Reprogramming of Fibroblasts into Functional Cardiomyocyte-like Cells without Viral Integration.” Osaka, Oct 2014)、2015 年に ISHR Young Investigator’s Award 優秀賞 (Miyamoto K et al. “Efficient cardiac reprogramming with Sendai viral vectors mediates through innate immune signaling”, Kobe, Dec 2015)、2018 年に第 2 回日本循環器学会基礎研究フォーラム Award Session 優秀賞を受賞 (Miyamoto K et al. “Direct Reprogramming with Sendai Virus Vectors Improves Cardiac Function In Vitro and In Vivo” Nara, Sep 2018) することができた。国際学会では 2013 年に ISHR 日本部会 (San Diego, USA, July 2013)、2015 年および 2017 年に AHA (米国心臓協会)において発表を行った(Orlando, Florida USA Nov 2015, Anaheim, Los Angeles USA, Nov 2017)。研究助成としては 2016 年度 科研費若手研究 B (研究課題名: センダイウイルスによる効率的な心筋直接誘導法の確立と分子メカニズムの解明)を獲得した。そして 2018 年、これまでの研究成果を国際科学雑誌において発表した(Miyamoto K et al. Direct In Vivo Reprogramming with Sendai Virus Vectors Improves Cardiac Function after Myocardial Infarction. Cell Stem Cell 2018 Jan 4; 22(1):91-103)。本論文はライフサイエンス新着論文レビュー (<http://first.lifesciencedb.jp/>)にて公開された。また上記研究成果が認められ、2018 年に第 1 回慶應義塾大学医学部内科学教室同窓会賞 基礎研究分野 猿田享男賞および 2019 年に東京都医師会医学研究賞を受賞した。当論文発表後も心筋直接誘導の分野においては国内外の研究機関より複数の研究成果が報告されており、本研究が今後の臨床応用の観点から大きな一歩になりうると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 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-mediated prostaglandin E2-prostaglandin E receptor 4 signaling in cardiac reprogramming. Nature Communications. 2019 Feb 20;10(1):674 (査読有り)
- 2) Miyamoto K, Akiyama M, Tamura F, Isomi M, Yamakawa H, Sadahiro T, Muraoka N, Kojima H, Haginiwa S, Kurotsu S, Tani H, Li Wang, Li Qian, 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 Jan 4;
22(1):91-103 (査読有り)

〔学会発表〕(計3件)

- 1) Miyamoto K, Tamura F, Akiyama M, Yamakawa H, Muraoka N, Sadahiro T, Kurotsu S, Kojima H, Haginiwa S, Tani H, Fukuda K, Ieda M. "Sendai Virus Vectors Achieve Mouse and Human Efficient Integration-Free Cardiac Reprogramming In Vitro and In Vivo." The 82th annual meeting of Japanese Circulation Society Featured Research Session, 2018 (Oral Presentation)
- 2) Miyamoto K, Akiyama M, Tamura F, Isomi M, Yamakawa H, Sadahiro T, Muraoka N, Kojima H, Haginiwa S, Kurotsu S, Fukuda K, Ieda M. "Sendai Virus Vectors Achieve Efficient Integration-Free Cardiac Reprogramming In Vitro and In Vivo." American Heart Association Scientific Sessions, 2017 (Poster Presentation)
- 3) Miyamoto K, Akiyama M, Muraoka N, Sadahiro T, Kojima H, Tamura F, Haginiwa S, Isomi M, Yamamoto S, Fukuda K, Ieda M. "Efficient and Safe Cardiac Reprogramming using Sendai Viral Vectors." The 81th annual meeting of Japanese Circulation Society, 2017 (Poster Presentation)

〔図書〕(計1件)

1. 宮本和享, 家田真樹 「心不全(第2版)上巻 - 最新の基礎・臨床研究の進歩 - 」
心不全の基礎研究 3.心筋再生医学 (2) ダイレクトリプログラミング 日本臨牀 76巻増刊号9,
p384-390, 日本臨牀社 2018

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。