

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16024

研究課題名(和文) 心臓前駆細胞誘導因子による新しい心筋誘導法の確立と分子機序解明

研究課題名(英文) Novel method of cardiac reprogramming with the regulator of cardiac progenitor cells.

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では心臓前駆細胞誘導因子として同定されたTbx6を用いて液性因子を用いずに遺伝子発現のみで心筋前駆細胞を誘導する方法を確立した。この方法により従来の液性因子を使用する方法よりも低コストかつ安定的な作製が可能になった。さらに本法では前駆細胞を誘導するため心筋細胞のみならず血管内皮細胞・血管平滑筋細胞の作製も可能な画期的な方法である。またこれまで不明であった心臓前駆細胞分化の分子メカニズムの解明にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在広く用いられている心筋誘導法は複数のサイトカインや化合物を使用するが、高コスト、工程が煩雑、分化メカニズムも不明などの課題があった。本研究で開発した方法はTbx6のみの発現で心臓前駆細胞を選択的に誘導することが可能なため、従来法と比較して安価かつ簡便な方法である。これらのことから今後の再生医療に大きく貢献することが予想される。

研究成果の概要(英文)：There are some problems in the method to induce pluripotent stem cells into cardiomyocytes using cytokines and small molecules. Here we show Tbx6 induces Cardiac progenitor cells (CPCs) from pluripotent stem cells (PSCs) and determines cardiovascular lineage specification via its temporal expression. This method is possible to solve the above problems. Moreover, we elucidated the molecular mechanisms of CPC differentiation.

研究分野：再生医療

キーワード：心臓再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

近年、生活習慣病とそれに伴う心疾患による死亡率は増加傾向にある。心臓は障害を受けると心筋細胞が減少して心不全にいたる。終末分化細胞である心筋細胞は再生能を持たないため、再生医療による新しい治療の開発が期待されており、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。現在、幹細胞からの効率の良い心筋細胞誘導法は、基本的には心臓発生の過程で重要となってくる TGF $\beta$  family member である activin、BMP や Wnt、FGF、VEGF のシグナル伝達経路を増強あるいは抑制するプロトコルである。Wnt に関しては幹細胞から心臓中胚葉の時期までは増強することで心臓前駆細胞が誘導され、逆に心臓前駆細胞から分化した心筋細胞を誘導するには Wnt シグナルをブロックする必要がある。このように時期特異的に同じシグナルを増強したりブロックしたりする方法は BMP や TGF $\beta$  でも報告されているが、幹細胞株間で適切なシグナル増強・抑制時期にばらつきがあり、心筋分化効率も異なるなど再現性に課題がある。また臨床応用には複数のサイトカインの使用による高コスト、工程が煩雑などの課題がある。これらのことから幹細胞からの簡便・効率的な心筋細胞誘導法を確立することが求められていた。

## 2. 研究の目的

上記の背景から幹細胞が心筋細胞へと分化する過程で一過性に出現する、中・内胚葉由来の心臓前駆細胞に着目した。心臓前駆細胞の特徴としては、自己複製能と高い心筋分化能を含めた多分化能が挙げられ、血管内皮細胞、平滑筋細胞など心臓内のすべての細胞に分化することが運命決定されている。幹細胞からの心臓前駆細胞誘導では上述の activin、BMP、Wnt、FGF シグナル活性化が重要だが、これまで心臓前駆細胞誘導の分子機序や心臓前駆細胞を直接誘導できるマスター因子は不明であった。この増殖能・多分化能を有する心臓前駆細胞を選択的に簡便な方法で作製できれば、高効率で心筋細胞や心臓構成細胞を得られると考え、心臓前駆細胞誘導法の確立とその分子機序の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) マウス ES 細胞から心筋細胞への分化過程における心臓前駆細胞誘導因子 Tbx6 の遺伝子発現パターンの解析

幹細胞から心臓前駆細胞を経て、心筋細胞へ分化する過程における新規心臓前駆細胞誘導因子 Tbx6 の遺伝子発現時期と発現細胞の同定を試みた。心臓前駆細胞で GFP を発現する T-GFP マウス ES 細胞を用いて、BMP、Activin A、VEGF など複数のサイトカインで幹細胞から心筋分化誘導(Directed differentiation)を行い、同定した因子の発現パターンを解析した。

(2) Tbx6 によるマウス ES 細胞からの心臓前駆細胞、心筋細胞分化誘導法の確立

次にマウス ES 細胞からサイトカインや化合物を使用せずに、心臓前駆細胞誘導因子 Tbx6 のみを用いて効率的に心臓前駆細胞や心筋細胞を含む心臓構成細胞に分化誘導することが可能か検討した。具体的な方法としては、T-GFP マウス ES 細胞を用いてドキシサイクリン(Dox)投与により Tbx6 の発現を制御できる ES 細胞株を新たに樹立し、時期特異的に Tbx6 を発現することが可能なシステムを構築した。

(3) マウス ES 細胞から心臓前駆細胞誘導の分子メカニズム解明

心臓前駆細胞誘導因子 Tbx6 が幹細胞から心臓前駆細胞を誘導できるマスター因子であることが示唆されたため、サイトカインによる幹細胞から心臓前駆細胞への分化にこの遺伝子が必須か検討した。具体的には、従来のサイトカインを用いる方法で心筋誘導する際に Tbx6 をノック

ダウンして、心臓前駆細胞および心筋への分化を検討した。また心臓前駆細胞誘導の分子メカニズムを解明するため、マイクロアレイで Tbx6 が制御する遺伝子を網羅的に解析した。さらに免疫クロマチン沈降 (ChIP assay) を用いて直接のターゲットとなる遺伝子を同定した。

(4) ヒト iPS 細胞から心筋細胞への分化過程における心臓前駆細胞誘導因子の遺伝子発現解析

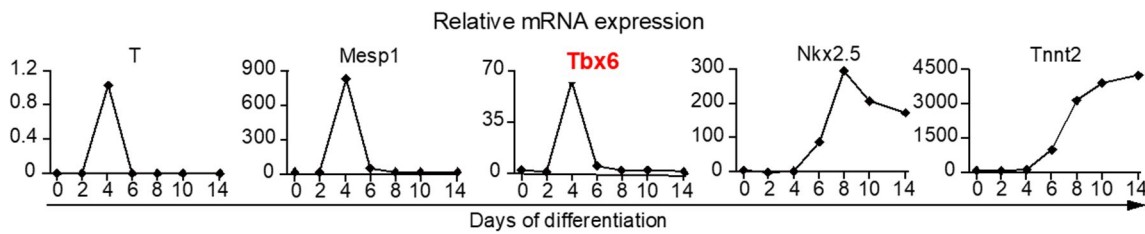
マウス同様に、ヒト iPS 細胞からの心筋分化における心臓前駆細胞誘導因子 Tbx6 の遺伝子発現パターンを QRT-PCR で解析した。

(5) 心臓前駆細胞誘導因子によるヒト iPS 細胞からの心臓前駆細胞、心筋細胞分化誘導法の確立

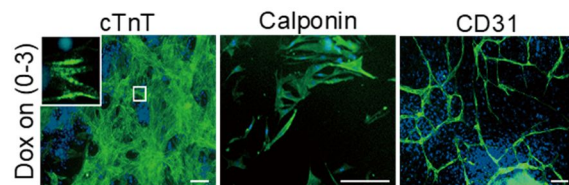
Dox 投与により心臓前駆細胞誘導因子 Tbx6 の発現を制御できるヒト iPS 細胞細胞株を樹立し、この因子の発現時期を制御することにより心筋細胞の誘導が可能か検討した。

#### 4. 研究成果

(1) T-GFP マウス ES 細胞から心筋細胞を誘導する過程で、Tbx6 が T-GFP 陽性の心臓前駆細胞に出現しており、またその発現パターンは他の心臓中胚葉遺伝子と類似したものであることが明らかになった。



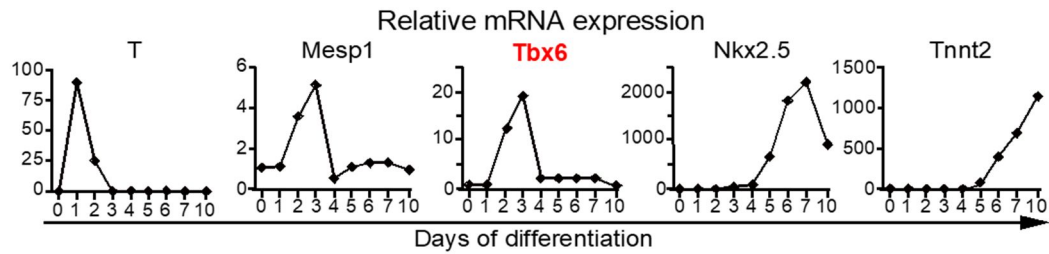
(2) Tet-On レンチウイルスに Tbx6 を搭載し、これをマウス ES 細胞に導入して Dox 投与により Tbx6 遺伝子発現を制御できる ES 細胞株を新たに樹立した。(1) で得られた Tbx6 の発現パターンをもとに Dox 投与時期を検討し、誘導開始後 3 日間の Tbx6 発現によりサイトカインを用いずに心臓前駆細胞を誘導することに成功した。この心臓前駆細胞をさらに分化させると約 67% が心筋に誘導され、培養条件の調節により血管内皮細胞や平滑筋等の心筋以外の心臓構成細胞へも分化させることができた。



(3) Tbx6 が心臓前駆細胞・心筋細胞の誘導に重要なマスター因子であることを確認するため、shRNA で Tbx6 をノックダウンした。この ES 細胞では中胚葉の誘導が抑制され、心筋細胞の誘導効率も顕著に減少することを確認し、Tbx6 が心筋分化に必須の遺伝子であることが示された。そこで Tbx6 による心臓前駆細胞誘導の分子メカニズムを明らかにするためマイクロアレイや GO term 解析を行い、Tbx6 が制御している遺伝子を網羅的に解析した。その結果 Tbx6 は中胚葉系遺伝子を誘導し、外胚葉系遺伝子群を抑制することにより中胚葉への分化を誘導していることが示唆された。さらにターゲット分子を同定するため ChIP assay を行ったところ、心筋分化に重要である Mesp1 のエンハンサー領域に直接結合して遺伝子発現を調節していた。これらのことから Tbx6 は Mesp1 に直接結合して作用し、内・中胚葉遺伝子を活性化することにより心臓前駆細胞を誘導するというメカニズムが明らかになった。

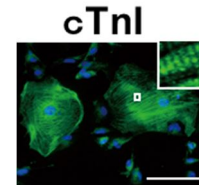
(4) ヒト iPS 細胞の心筋分化における Tbx6 の関与を調べるため、マウス ES 細胞実験と同様に分化過程での遺伝子発現パターンを調べた。その結果、マウスと同じく T (Brachyury) や

Mesp1 の発現上昇がみられる時期に一過性に Tbx6 の発現が認められた。



(5)(4)の結果を踏まえ、ヒト iPS 細胞においても Tet-On システムにより Tbx6 発現を制御できる細胞株を樹立して Tbx6 のみでの心筋前駆細胞の誘導を試みた。

新たに樹立したこの iPS 細胞株において誘導開始前の 1 日間のみ Tbx6 を発現させると誘導開始後 1 日目に心臓前駆細胞のマーカーである T や Mesp1 の発現が確認された。その後心筋誘導に適した環境下で分化誘導を進め、拍動する心筋細胞まで分化させることができた。



本研究では、これまでに心臓の分化においてその役割が不明であった Tbx6 が重要な役割を担っており、さらに Tbx6 単独で心臓前駆細胞を誘導することができることを明らかにした。またマウス・ヒトの両方で同じ遺伝子を用いて心筋細胞を分化誘導することに成功した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Isomi Mari、Sadahiro Taketaro、Ieda Masaki	4. 巻 73
2. 論文標題 Progress and Challenge of Cardiac Regeneration to Treat Heart Failure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 97～101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jjcc.2018.10.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sadahiro Taketaro、Isomi Mari、Muraoka Naoto、Kojima Hidenori、Haginiwa Sho、Kurotsu Shota、Tamura Fumiya、Tani Hidenori、Tohyama Shugo、Fujita Jun、Miyoshi Hiroyuki、Kawamura Yoshifumi、Goshima Naoki、Fukuda Keiichi、Ieda Masaki	4. 巻 23
2. 論文標題 Tbx6 Induces Nascent Mesoderm from Pluripotent Stem Cells and Temporally Controls Cardiac versus Somite Lineage Diversification	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 382～395.e5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stem.2018.07.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Muraoka Naoto、Nara Kaori、Tamura Fumiya、Kojima Hidenori、Yamakawa Hiroyuki、Sadahiro Taketaro、Miyamoto Kazutaka、Isomi Mari、Haginiwa Sho、Tani Hidenori、Kurotsu Shota、Osakabe Rina、Torii Satoru、Shimizu Shigeomi、Okano Hideyuki、Sugimoto Yukihiko、Fukuda Keiichi、Ieda Masaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Role of cyclooxygenase-2-mediated prostaglandin E2-prostaglandin E receptor 4 signaling in cardiac reprogramming	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-08626-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 磯見まり
2. 発表標題 新規心臓前駆細胞誘導因子によるヒトES/iPSからの簡便な心筋
3. 学会等名 Molecular Cardiovascular Metabolic Conference
4. 発表年 2017年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----