

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08047

研究課題名（和文）心筋直接リプログラミングにおける、心筋梗塞病変への生体転化の基盤研究

研究課題名（英文）Fundamental research on direct myocardial reprogramming of the myocardium for biotransformation into infarct lesions.

研究代表者

山川 裕之（YAMAKAWA, Hiroyuki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：80465020

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究より、効率的に 維芽細胞から心筋梗塞 に効率的に遺伝子導入をする方法を探索している。その中で、共同研究を行った心筋梗塞での治療として、細胞のゲノムを損傷することなく 3つの心筋誘導遺伝子を導入して、心筋梗塞 の心臓線維芽細胞を直接的に心筋細胞へ転換して、心機能を改善することに成功した。2020年以降、細胞移植を必要としない新しい心筋再生法として、心筋以外の心臓線維芽細胞に心筋誘導遺伝子を導入して、心筋を直接作製する研究を行っている。本研究では、張型心筋症やファブリー病の伝性心筋症にも注目をし、心筋直接誘導が改善できるコンストラクトを作成している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、単に心筋梗塞だけではなく、張型心筋症やファブリー病の伝性心筋症にも注目をし、心筋直接誘導が改善できることを目標として、条件検討を行っている。その結果により、遺伝性心筋症の患者に対しても、細胞移植を必要としない新しい心筋再生方法を確立することが期待できる。よって、この心筋直接リプログラミングによる心筋再生技術は、iPS細胞誘導心筋細胞移植とは異なる、再生医療への用途が期待できるようになる。

研究成果の概要（英文）：From this research, we are searching for an efficient method of gene transfer from fibroblasts to myocardial infarction. In this study, we are searching for a method of efficient gene transfer from fibroblast cells to myocardial infarction cells. We are conducting research on the direct creation of cardiac muscle by introducing cardiac muscle-inducing genes into cardiac fibroblasts other than cardiac muscle. In this study, we are also focusing on Zhang's cardiomyopathy and Fabry's transmissible cardiomyopathy to create constructs that can improve direct myocardial induction.

研究分野：心筋再生、心筋症

キーワード：心筋再生 心筋症 心筋リプログラミング

1. 研究開始当初の背景

世界保健機関(WHO)が発表した「世界保健統計」によると、2008年の世界の総死亡数は、5700万人で、心疾患による年間死亡数は1700万人であり、生活習慣病の中で1位である。さらに、高齢化が進む2030年には2500万人に増加すると予測される。心疾患の中でも、急性心筋梗塞の患者は60~70%を占めている。

現在、心臓カテーテル治療が進んでいるにもかかわらず、心筋梗塞患者が、病院に到着し、軽快退院するのは3割程度である。しかも心筋梗塞領域が広範囲であると、極度に心機能の低下した心不全患者が増加する。心筋梗塞は、一度心筋細胞が障害を受けると、再生できず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する。そのため、治療が遅れると、救命はできる可能性はあるが左室収縮力が低下する。結果、慢性心不全の患者が増加し、入退院を繰り返す人が増加する。極度の高齢社会を迎えるにあたり、高血圧、糖尿病、脂質異常症などが増え、さらに心疾患患者は増加の一途をたどることが予想される。結果として、今後も心不全患者が増加し、医療経済を圧迫してしまう。

2000年代に入り、細胞工学の発達により、ES/iPS細胞などの幹細胞から心筋細胞などへの分化・誘導が可能となり、重症心筋梗塞患者への応用に関心を集めている。ES/iPS細胞の作製から心筋細胞を分化誘導するまでに数か月を費やすこと、ガン化の問題など克服すべき問題があった。

しかし、2010年にIedaらが3つの心筋特異的転写因子(Gata4、Mef2c、Tbx5:以降GMTと略す)を強発現することで、線維芽細胞からiPS細胞を介さずに心筋細胞の直接誘導に成功し、上記の問題を一蹴した(Ieda M et al, Cell, 2010)。この細胞を誘導心筋様細胞(induced cardiomyocyte:iCM細胞)と名付けた。この報告を契機に、さらに心臓再生医療に反映できる可能性が高くなり、注目を集めるようになった。2012年に本申請者らは、心筋梗塞モデルマウスに、GMTを直接注入することで心筋細胞を再生させた(Inagawa M, Yamakawa H et al, Circ. Res. 2012)。しかし、生体内での心筋直接リプログラミングは、1%程度しか存在せずに、心機能を改善するまでには至らなかった。

2. 研究の目的

心筋梗塞は、一度心筋細胞が障害を受けると、再生できず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する。近年、心臓の収縮能力を改善するためにES/iPS細胞を中心とした心筋再生医療が次世代の心臓病治療として注目されている。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)。しかし、心臓線維芽細胞から誘導心筋細胞(iCM細胞)への誘導は5~20%程度であり、さらに収縮能力を有する作業心筋細胞は約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 上段・中段)。

本研究では2万個存在する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(Z因子)の選定法を構築する。選定した転写因子から、新たな心筋誘導転写因子の候補を特定し、線維芽細胞から大量の作業心筋細胞を得ることを目的とする(図1 下段)。さらには心筋梗塞領

域に直接「新たな心筋誘導転写因子」を注入し心筋再生を行うことを目指す(図 2)。

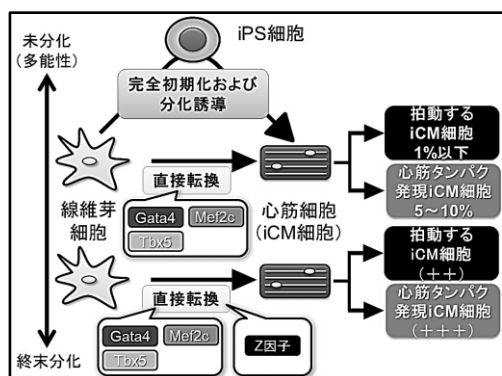


図 1 線維芽細胞から心筋誘導は 2 種類存在する (上段:iPS 細胞から誘導した心筋細胞。中絶:直接誘導心筋細胞(iCM 細胞)、下段:Z 因子を加えた iCM 細胞)

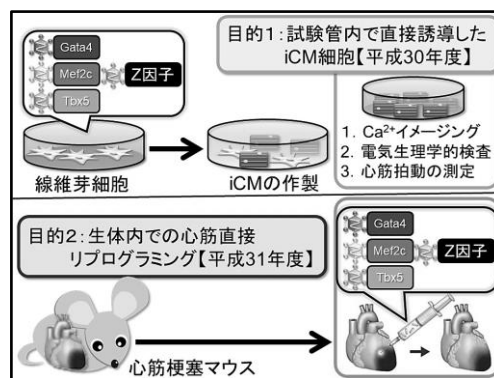


図 2 線維芽細胞から心筋誘導は 2 種類存在する (上段:試験管内での Z 因子の選定(iCM 細胞)、下段:Z 因子+GMT を心筋梗塞領域に加え心機能を評価)

3. 研究の方法

新たな心筋誘導転写因子の候補を特定し、線維芽細胞から直接に効率的な大量の作業心筋細胞を得ることを目的とする。さらには心筋梗塞領域に直接、「GMT+新たな心筋誘導転写因子(Z 因子)」を注入し心筋再生を行うことを目指す。

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(図 2)。

【目的 1】新規心筋成熟転写因子(Z 因子)同定と GMT+Z 因子誘導 iCM 評価 (図 2 方法 1)

【目的 2】心筋梗塞モデルマウスでの生体内直接リプログラミングによる心筋誘導(図 2 方法 2)

これまでの研究成果として、我々は 2 万個のヒト転写因子から、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「心筋成熟誘導転写因子」の候補を同定する。

4. 研究成果

我々は、前述の目的で研究を進めていったが、途中で心筋症の一つである遺伝子治療を行うための基盤研究へ注目して進めることとなった。心不全の原因の多くは、虚血性心疾患であるが、他にも数多くの遺伝性心筋症なども含む。心筋症の多くは希少疾病であるライソゾーム病(ファブリー病などを含む 50 種以上の疾患群)やアミロイドーシスを含む遺伝性心筋症であり、治療法が現存しない疾患や、年間に数千万円の高額医療費が必要な疾患も少なくなく、根本的な治療法を確立することが急務である。

共同研究者である ID ファーマ 草野らが開発したゲノム編集技術で、CRISPER/Cas9 法の問題点を解決した日本初の画期的なゲノム編集技術であり、これがゲノム編集のブレークスルーとなると考える。この技術の利点として、ゲノム編集技術の基盤を構築しつつある状況である。

本研究では、単に心筋梗塞だけではなく、ファブリー病の伝性心筋症に注目をし、心筋直接誘導が改善できるコンストラクトを作成している。その結果により、遺伝性の心筋症の患者に対しても、細胞移植を必要としない新しい心筋再生方法を確立することが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Yamakawa Hiroyuki, Kusumoto Dai, Hashimoto Hisayuki, Yuasa Shinsuke | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Stem Cell Aging in Skeletal Muscle Regeneration and Disease | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 1830 ~ 1830 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21051830 | 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 Yukihiro, 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 674 |
| 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 - |
| 1. 著者名 Isomi Mari, Sadahiro Taketaro, Yamakawa Hiroyuki, Fujita Ryo, Yamada Yu, Abe Yuto, Murakata Yoshiko, Akiyama Tatsuya, Shu Tsugumine, Mizukami Hiroaki, Fukuda Keiichi, Ieda Masaki | 4. 巻 143 |
| 2. 論文標題 Overexpression of Gata4, Mef2c, and Tbx5 Generates Induced Cardiomyocytes Via Direct Reprogramming and Rare Fusion in the Heart | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Circulation | 6. 最初と最後の頁 2123 ~ 2125 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.052799 | 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 Kurotsu Shota, Sadahiro Taketaro, Fujita Ryo, Tani Hidenori, Yamakawa Hiroyuki, Tamura Fumiya, Isomi Mari, Kojima Hidenori, Yamada Yu, Abe Yuto, Murakata Yoshiko, Akiyama Tatsuya, Muraoka Naoto, Harada Ichiro, Suzuki Takeshi, Fukuda Keiichi, Ieda Masaki | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 Soft Matrix Promotes Cardiac Reprogramming via Inhibition of YAP/TAZ and Suppression of Fibroblast Signatures | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Stem Cell Reports | 6. 最初と最後の頁 612 ~ 628 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2020.07.022 | 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 Yamakawa Hiroyuki、Ieda Masaki | 4. 巻 41 |
| 2. 論文標題 Cardiac regeneration by direct reprogramming in this decade and beyond | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration | 6. 最初と最後の頁 epub |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-021-00168-5 | 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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

| |
|------------------------------|
| 1. 発表者名 山川裕之 |
| 2. 発表標題 心筋症の鑑別 ファブリー病 |
| 3. 学会等名 第24回 日本心不全学会 学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山川裕之 |
| 2. 発表標題 マルチモダリティを用いた心臓病理の解釈 ミクロレベル編・マクロレベル編 |
| 3. 学会等名 第24回 日本心不全学会 学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hiroyuki Yamakawa |
| 2. 発表標題 A case of myeloma cast nephropathy complicated by Fabry disease after withdrawal from dialysis |
| 3. 学会等名 WORLDSymposium 2020 (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hiroyuki YAMAKAWA |
| 2. 発表標題 Fabry disease has been found by using of the tumor mutational burden analysis of 3000 Japanese cancer genimis using whole genome exome and targeted gene panel seqencing:Project Hightech Omics-based Patient Evaluation (Project HOPE) (2/ |
| 3. 学会等名 WORLDSymposim 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|