

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08114

研究課題名(和文) 多能性幹細胞からの中胚葉誘導マスター因子の同定と、選択的心臓中胚葉誘導法の確立

研究課題名(英文) Identification of master factors for mesoderm induction from pluripotent stem cells and establishment of a method for selective cardiac induction

研究代表者

貞廣 威太郎 (Sadahiro, Taketaro)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：60571130

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)：多能性幹細胞から心筋細胞を誘導するためには、複数の液性因子を使用し、心臓中胚葉を誘導してから心筋に分化させる方法が一般的である。しかし、この方法には誘導工程が煩雑、液性因子が高価であるという課題がある。我々は中胚葉誘導マスター遺伝子Tbx6を発見し、マウスES細胞・ヒトiPS細胞等の多能性幹細胞から、液性因子を使用せずに心臓中胚葉細胞を誘導できることを発見した。さらにTbx6の発現期間を調整することで、同じく中胚葉から分化する骨格筋や軟骨細胞も誘導が可能であることを見出した。さらにTbx6遺伝子が心筋細胞増殖効果をもつことも明らかにし、新たな心筋再生療法の可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界総死亡数のなかで、心疾患は約半数を占める。終末分化細胞である心筋細胞には増殖能がなく、一度低下した心臓機能が回復することは困難である。ES細胞、iPS細胞などの幹細胞から、心臓幹細胞である心臓中胚葉を経て分化した誘導心筋は、再生医療のツールとして期待されるが、液性因子による誘導が必須である。この誘導法は、高価な液性因子によるコストの問題以外に、誘導手法が不安定かつ煩雑という課題がある。液性因子に頼らず、単一遺伝子によって多能性幹細胞から選択的な心臓中胚葉・心筋細胞への誘導が可能となる本研究成果により安定かつ簡便、さらに安価に心筋作製が可能となり、心臓再生医療の飛躍的な前進が期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to induce cardiomyocytes from pluripotent stem cells, it is common to use multiple growth factors to induce cardiac mesoderm and then differentiate it into cardiomyocytes. However, this method suffers from the complexity of the induction process and the high cost of growth factors. We have discovered that cardiac mesoderm cells can be induced from pluripotent stem cells, such as mouse ES cells and human iPS cells, without the use of growth factors by overexpression of Tbx6. Furthermore, we found that skeletal muscle and chondrocytes can be induced by adjusting the expression period of Tbx6. We also found that the Tbx6 gene has a proliferative effect on cardiomyocytes, indicating the possibility of a new cardiac regeneration therapy.

研究分野：再生医療

キーワード：再生 多能性幹細胞 中胚葉 発生

### 1. 研究開始当初の背景

ES 細胞などの幹細胞から分化した心筋細胞は、心疾患における再生医療・創薬研究のツールとして期待されるが、適切な誘導法が必須である。発生学の知見から Activin, BMP などの液性因子によって幹細胞が中胚葉に分化し、液性因子による目的外系統への分化阻害により、中胚葉から心臓の原器である心臓中胚葉、骨格筋・軟骨の原基となる沿軸中胚葉への分化制御が行われていることが示された。しかし液性因子による誘導制御は高コストに加え、幹細胞ライン間での誘導効率差や、液性因子の微細な濃度調節など、作製工程が不安定かつ煩雑という課題がある。さらに心臓中胚葉誘導マスター因子や、中胚葉から各種細胞への分化制御機構は明らかではない。我々の研究室ではこれまでに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、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、Gata4、Mef2c、Tbx5 の 3 つの心筋特異的転写因子が、線維芽細胞から iPS 細胞を経ずに直接心筋細胞 (iCM 細胞) を誘導できるリプログラミング因子であ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, Yamakawa et al, Stem cell report 2015) しかしこれまで心臓中胚葉リプログラミング因子の報告はない。そこでまず、線維芽細胞から心臓中胚葉へのリプログラミング因子を同定する研究を行った。これまでの予備実験で産総研が所有する世界最多の cDNA ライブラリーを用いて、心臓中胚葉誘導因子のスクリーニングを行った。中胚葉から誘導される最初の臓器が心臓である点に着目し、幹細胞から心臓中胚葉由来細胞を誘導するマスター因子は中胚葉と心臓中胚葉の両方で発現していると考えた。ES 細胞から分化させた心臓中胚葉のマイクロアレイデータを用いて、同時期特異的に上昇する転写因子であり、ロ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遺伝子を候補因子とした。

### 2. 研究の目的

幹細胞からの心筋誘導における必須の要素であり、問題点でもある液性因子を使用せず、遺伝子発現のみで多能性幹細胞から中胚葉、中胚葉から選択的な心臓中胚葉への誘導が実現すれば、安定かつ簡便、さらに安価に心筋細胞の作製が可能となる。本研究により多能性幹細胞からの中胚葉誘導、分化制御機構が明らかとなった場合、発生学の知見を応用することで発展してきた幹細胞・再生分野において、新規誘導法の確立など大きな影響を与えることが期待される。また中胚葉からは心筋以外にも骨格筋や軟骨といった筋骨格系の細胞が誘導可能であるが、液性因子による誘導では、特に骨格筋への誘導が困難であることが知られている。本研究成果により遺伝子発現調節のみで幹細胞から中胚葉、心筋細胞・骨格筋細胞・軟骨を選択的に誘導できる事が可能となれば、心臓以外の中胚葉由来臓器における再生医療・創薬研究の開発など、多くの応用が可能となる画期的な研究といえる。

### 3. 研究の方法

- (1) 多能性幹細胞からの心臓中胚葉誘導因子のスクリーニング
- (2) 遺伝子発現制御マウス ES 細胞を用いた心臓中胚葉・心筋誘導の確立
- (3) 遺伝子発現による心臓中胚葉誘導の分子生物学的機序の解明
- (4) 遺伝子発現によるマウス ES 細胞からの骨格筋・軟骨誘導の確立
- (5) 遺伝子発現による心筋細胞増殖法の確立

### 4. 研究成果

#### (1) 多能性幹細胞からの心臓中胚葉誘導因子のスクリーニング

産総研が所有する世界最多の cDNA ライブラリーを用いて、誘導因子をスクリーニングした。心臓中胚葉のマイクロアレイデータと、マウス体内中胚葉細胞の single cell-RNA seq データを統合し、中胚葉・心臓中胚葉特異的に発現する転写因子 Tbx6 を同定した。CRISPR-Cas9 を用いて Tbx6 遺伝子を欠損させた ES 細胞では中胚葉・心筋誘導が著明に抑制され、Tbx6 が幹細胞からの心筋誘導におけるマスター因子である可能性が示された。(図 1,2)

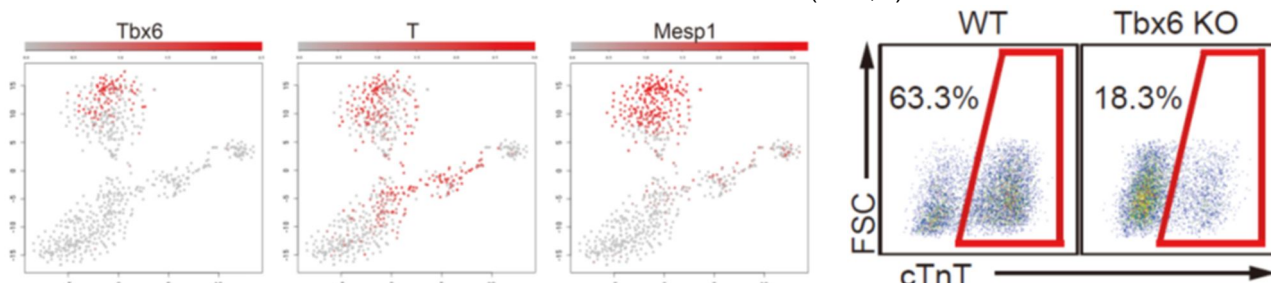


図 1: single cell-RNA seq (t-SNE)

図 2: FACS による心筋定量(トロポニン T)

(Tbx6 は心臓中胚葉マーカーの T, Mesp1 発現と一致) (Tbx6 KO で誘導効率は 1/3 に減少した)

## (2) Tbx6 発現制御マウス ES 細胞を用いた心臓中胚葉・心筋誘導の確立

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。Tbx6 発現のみで心臓中胚葉、心筋細胞への誘導が可能かを検討し、液性因子を使用せず、約 88% の ES 細胞が心臓中胚葉細胞に誘導された。約 67% の細胞が心筋に誘導され、液性因子による心筋誘導効率よりも良好であった。平滑筋・血管内皮細胞への分化も確認し、全ての心臓構成細胞への分化が達成された。(図 3,4)

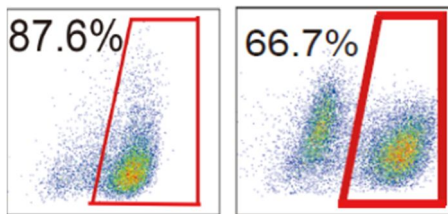


図 3:FACS による定量評価  
心臓中胚葉(左)、心筋(右)

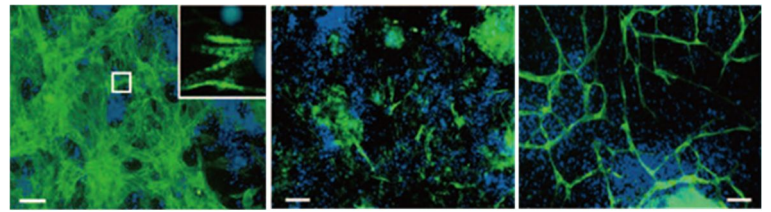


図 4:免疫染色  
左-心筋(トロポニン T)、中-平滑筋(Calponin)、  
右-血管内皮細胞(CD31)

## (3) Tbx6 発現による心臓中胚葉誘導の分子生物学的機序の解明

DNA マイクロアレイでは、Tbx6 発現により中胚葉・心臓発生関連遺伝子が上昇、神経発生関連遺伝子が抑制されていた。ChIP による解析の結果、Tbx6 は心臓分化因子 Mesp1・BMP4、神経分化因子 Sox2 と直接結合し Mesp1・BMP4 発現を誘導、Sox2 発現を抑制しており、Tbx6 の直接作用が心臓中胚葉誘導の機序であることが判明した(図 5)。また Tbx6 には心臓中胚葉誘導に重要なシグナルである BMP4、Activin、Wnt のパラクライン作用を持つことを確認し、Tbx6 が直接的、間接的作用によって心臓中胚葉を誘導していることを発見した。

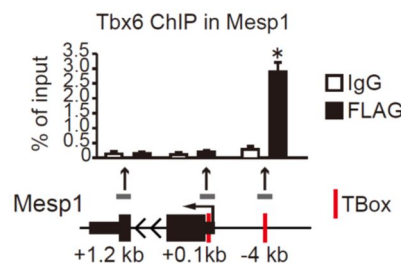


図 5:ChIP PCR. (Tbx6 は Mesp1 に直接結合し、発現を誘導している)

## (4) Tbx6 発現によるマウス ES 細胞からの骨格筋・軟骨誘導の確立

Tbx6 は骨格筋・軟骨の原基(沿軸中胚葉)との関連も知られている。体節は心臓の分化後に分化するため、Tbx6 発現期間を心臓中胚葉誘導に必要な期間よりも延長したところ、幹細胞から心臓中胚葉誘導後に沿軸中胚葉が誘導され、骨格筋・軟骨へ分化した(図 6・7)。その機序が Tbx6 発現による Wnt3 を介した心筋分化阻害因子の誘導であることが判明し、Tbx6 が心血管系と筋骨格系への分化を制御する中胚葉誘導制御のマスター因子である可能性が示唆された。

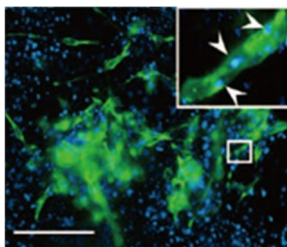


図 6:免疫染色. 骨格筋(MHC)

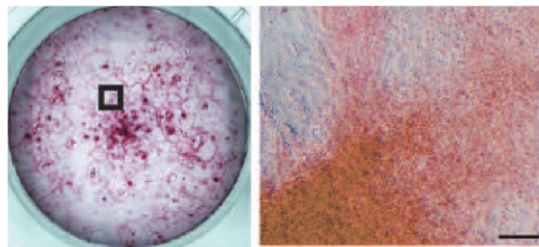


図 7:Safranin-O 染色. 軟骨

## (5) Tbx6 発現による心筋細胞増殖法の確立

Tbx6 遺伝子が、心筋細胞にどのような影響を及ぼすのか検討するため、心筋細胞に、Tbx6 遺伝子を過剰発現させたところ、終末分化細胞として増殖能を失った心筋細胞の細胞周期を再活性化させることが明らかとなり、生体内外の心筋細胞の増殖を促進することが可能な遺伝子であることを発見する事が出来た。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sadahiro Taketaro, Ieda Masaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Direct Cardiac Reprogramming for Cardiovascular Regeneration and Differentiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Keio Journal of Medicine	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) 10.2302/kjm.2019-0008-0A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sadahiro Taketaro	4. 巻 11
2. 論文標題 Cardiac regeneration with pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes and direct cardiac reprogramming	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 95 ~ 100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.06.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Haginiwa Sho, Sadahiro Taketaro, Kojima Hidenori, Isomi Mari, Tamura Fumiya, Kurotsu Shota, Tani Hidenori, Muraoka Naoto, Miyake Noriko, Miyake Koichi, Fukuda Keiichi, Ieda Masaki	4. 巻 513
2. 論文標題 Tbx6 induces cardiomyocyte proliferation in postnatal and adult mouse hearts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1041 ~ 1047
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.04.087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 1 - 15
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Darwish Mohamed、Nishizono Hirofumi、Uosaki Hideki、Sawada Hitomi、Sadahiro Taketaro、Ieda Masaki、Takao Keizo	4. 巻 317
2. 論文標題 Rapid and high-efficient generation of mutant mice using freeze-thawed embryos of the C57BL/6J strain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience Methods	6. 最初と最後の頁 149 ~ 156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jneumeth.2019.01.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tani Hidenori、Sadahiro Taketaro、Ieda Masaki	4. 巻 19
2. 論文標題 Direct Cardiac Reprogramming: A Novel Approach for Heart Regeneration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2629 ~ 2629
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19092629	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sadahiro Taketaro、Isomi Mari、Muraoka Naoto et al.	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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 1件）

1. 発表者名 Taketarō Sadahiro
2. 発表標題 Tbx6 is Critical for Mesoderm Induction and Specification Into Cardiovascular and Somite Lineages
3. 学会等名 AHA（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 貞廣威太郎、家田真樹	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 220
3. 書名 疾患に挑むメカノバイオロジー	

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 線維芽細胞からの心臓前駆細胞と心筋細胞の直接製造方法	発明者 家田 真樹、貞廣 威太郎、磯見 ま り、五島 直樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2017/009052	取得年 2018年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 多能性幹細胞からの心臓前駆細胞と心筋細胞の製造方法	発明者 家田 真樹、貞廣 威太郎、磯見 ま り、五島 直樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2017/009053	取得年 2018年	国内・外国の別 外国

〔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
---------	---------