

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15861

研究課題名（和文）心筋増殖転写因子の同定と急性期心筋梗塞の新規治療法の確立

研究課題名（英文）Tbx6 Induces Cardiomyocyte Proliferation in Postnatal and Adult Mouse Hearts

研究代表者

萩庭 頌（HAGINIWA, SHO）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：00772584

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）：in vitroで胎児期心筋細胞に特異的に発現する24の転写因子を用いてスクリーニングを行いTbx6を同定した。そしてin vivoの実験系で、生体内の成熟心筋細胞に遺伝子導入を行い成熟心筋細胞を増殖させた。さらにマイクロアレイを用いた網羅的な解析により、新規心筋増殖転写因子が細胞周期レギュレーターの発現を変更することによって、生後および成体のマウスの心臓における心筋細胞の増殖を促進することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋細胞は胎児期では盛んに増殖するが、生後は再生能力をほとんど失うため、一度心筋障害を受けると回復は困難である。我々は、心臓内の自己の細胞から心筋を作製する、新しい心臓再生研究に取り組んでいる。本研究は、胎児期の心筋細胞に特異的に発現する転写因子の中から、成熟心筋細胞の分裂を促進させる新規因子を同定し、心筋自体を分裂させる新しい心臓再生法を開発することが主眼である。

研究成果の概要（英文）：Cardiovascular disease is a leading cause of death worldwide. Mammalian cardiomyocytes (CMs) proliferate during embryonic development, whereas they largely lose their regenerative capacity after birth. Defined factors expressed in cardiac progenitors or embryonic CMs may activate the cell cycle and induce CM proliferation in postnatal and adult hearts. Here, we report that the overexpression of Tbx6, enriched in the cardiac mesoderm (progenitor cells), induces CM proliferation in postnatal and adult mouse hearts.

We next generated a recombinant adeno-associated virus serotype 9 vector encoding Tbx6 (AAV9-Tbx6) for transduction into mouse CMs in vivo. The subcutaneous injection of AAV9-Tbx6 into neonatal mice induced CM proliferation in postnatal and adult mouse hearts. Mechanistically, Tbx6 overexpression upregulated multiple cell cycle activators. Thus, Tbx6 promotes CM proliferation in postnatal and adult mouse hearts by modifying the expression of cell cycle regulators.

研究分野：心筋再生

キーワード：再生医療 遺伝子治療 細胞周期

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重症心不全をはじめとした心臓病は我が国における死因の常に上位を占めており、新しい治療の開発が急務である。心臓再生は心臓病の新しい治療法として脚光を集めており、iPS細胞などの幹細胞を用いた細胞移植法は期待されているが、その使用には幹細胞混入による腫瘍形成の可能性、移植細胞の長期生着の問題、周囲の心筋組織との電気的結合など様々な課題が指摘されている。これに対し我々は心臓再生の新しいアプローチとして、心臓内に存在する自己の細胞から生体内で直接心筋細胞を作製する再生研究を行ってきた。

これまでに、我々は心臓内に多数存在する心臓線維芽細胞を生体内で直接心筋細胞へ分化転換する心筋直接リプログラミング研究を開発した。これまで体細胞を心筋に転換できる心筋マスター遺伝子は長らく発見されていなかったが、最初に14の心筋特異的転写因子を *in vitro* の系でスクリーニングして、最終的に *Gata4/Mef2c/Tbx5* の3つの遺伝子の組み合わせで心臓線維芽細胞を心筋細胞に直接リプログラミングできることを世界に先駆けて発見した (Ieda et al, *Cell* 2010)。

その後、*in vitro* で得られた *Gata4/Mef2c/Tbx5* の3つの遺伝子により、生体内でも心筋梗塞部位の線維芽細胞から心筋細胞を直接作製できることを報告した (Inagawa et al, *Circ Res*, 2012)。これらの結果は、*in vitro* のスクリーニングの結果を *in vivo* に応用できることを示している。また我々らはこれまでに同様の手法を用いることで、ヒト心筋リプログラミングにも成功している (Wada R et al, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013) (Muraoka N et al, *EMBO J*, 2014)。一方、心臓内でもう一つの有力な心筋の細胞源となりうる心筋細胞は人を含めてマウスなどの哺乳動物では胎児期と新生児期のごくわずかな期間を除いて心筋細胞の分裂が非常に制限されていることが報告されている。もし生体内の成熟心筋細胞を分裂増殖可能にする因子が同定できれば新しい心臓再生法になりうるのではと考えた。心筋増殖因子は、これまでも *c-myc* や *Hippo* シグナル関連因子などの癌関連遺伝子が報告されており、外部からの遺伝子導入で心筋細胞が分裂する可能性が示されている。しかしながら、これらの因子は *oncogene* であるため、他の臓器や細胞に癌を引き起こす危険性があり臨床応用には適さない。

そこで我々は、心筋細胞は胎児期に盛んに増殖することに着目し、胎児期心筋特異的転写因子を用いることで成熟心筋を増殖可能な心筋にリプログラミングすることが可能であるという仮説を立てた。もしこの方法が可能になれば *oncogene* でないため癌化のリスクはなく、さらに心筋特異的転写因子であるため他の細胞に転換する可能性もないなど、安全面でこれまでに報告された因子より圧倒的に有利であった。

2. 研究の目的

本研究は胎児期心筋に特異的な転写因子を用いて、心臓に内在する成熟心筋細胞を増殖可能な心筋へとリプログラミングして心臓再生するという従来にない新しい概念の再生研究である。本研究により外部からの細胞移植によらない、内在性心筋細胞を用いたより安全で簡便な心筋再生の方法を新たに確立することができる。この研究はこれまで自らが積み上げてきた胎児期心筋細胞の遺伝子発現データ、最適化した *in vitro* スクリーニング法、さらにこれまで心筋直接リプログラミング研究で得てきた多くの知見や材料を利用しており、他より圧倒的に優位な立場で研究を進められる。これまでの心筋増殖研究では *oncogene* など機能既知の遺伝子を用いているが、本研究では胎児期心筋特異的転写因子を用いるため安全性が高く、臨床への実用化をしやすい。成熟心筋細胞を増殖可能な胎児期様心筋へとリプログラミングする分子基盤解明は神経細胞など様々な終末分化細胞に応用できる可能性があり、その理解は心臓再生実現のみならず他の研究領域へも大きな波及効果を期待できるものである。

3. 研究の方法

本研究課題では、最初に *in vitro* のスクリーニングで新規心筋増殖転写因子を同定した。候補因子としては、胎児期心筋特異的に発現する24の転写因子を用いた。次に心筋増殖転写因子を *in vivo* の実験系に応用して、生体内の成熟心筋細胞を増殖可能な心筋にリプログラミングして心臓増殖を行った。さらに心筋増殖転写因子による心筋細胞増殖の分子機構を解明した。

まずラット心筋細胞を用いた *in vitro* のスクリーニング系で新規心筋増殖転写因子を同定した。我々はこれまでに胎児期心筋特異的な遺伝子プロファイルを解析しており、24の転写因子を候補因子として同定した。実験方法は24の転写因子を発現するレンチウイルスベクターを作製して、心筋細胞に導入し *EdU* assay で増殖する心筋を定量的に解析し、新規心筋増殖転写因子を同定した (図1)。次に臨床応用可能な心筋増殖転写因子を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを作製し、実際に生後間もないマウスに投与し、その効果を確認、解析を行った。さらに、増殖した心筋細胞を用いてマイクロアレイで網羅的解析を行った。

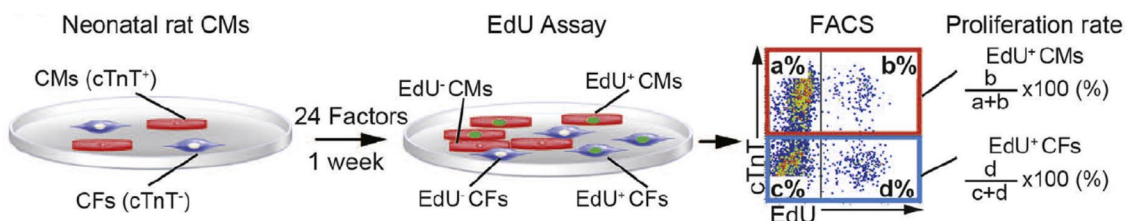


図1: FACSによるEdU assay

4. 研究成果

これまでの実験で、転写因子として Tbx6 の同定(図 2)と、生体内で Tbx6 を発現するアデノ随伴ウイルスベクターの作製に成功した。そして、同ベクターを用いて、新生児マウス心筋細胞に転写因子の導入を実施したところ、細胞周期マーカーである Brdu、PH3 陽性の増殖心筋細胞が確認できた。さらに、Adult マウスにおいても同因子の導入で、同様の効果が確認できた(図 3)。また、これらの心筋細胞から RNA を抽出しマイクロアレイを実施した。この網羅的な解析により、新規心筋増殖転写因子が Aurkb、Mki67、Ccna1、および Ccnb2 を含む複数の細胞周期活性化因子を上方制御し、腫瘍抑制因子 Rb1 を抑制することで細胞周期レギュレーターの発現を変更することによって、生後および成体のマウスの心臓における CM の増殖を促進することを確認した(図 4)。

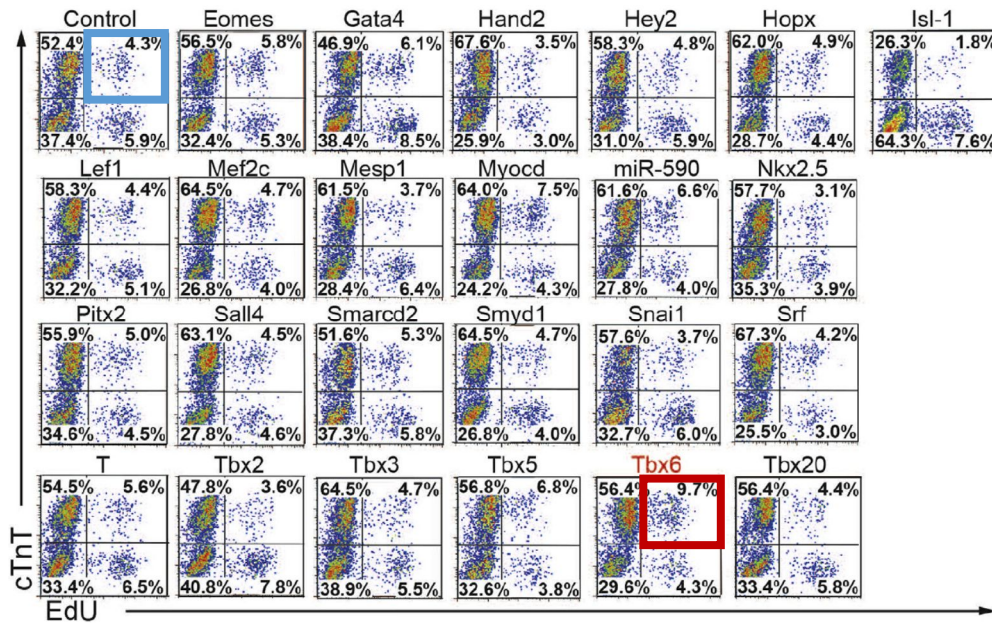


図 2: 心筋増殖転写因子として Tbx6 を同定

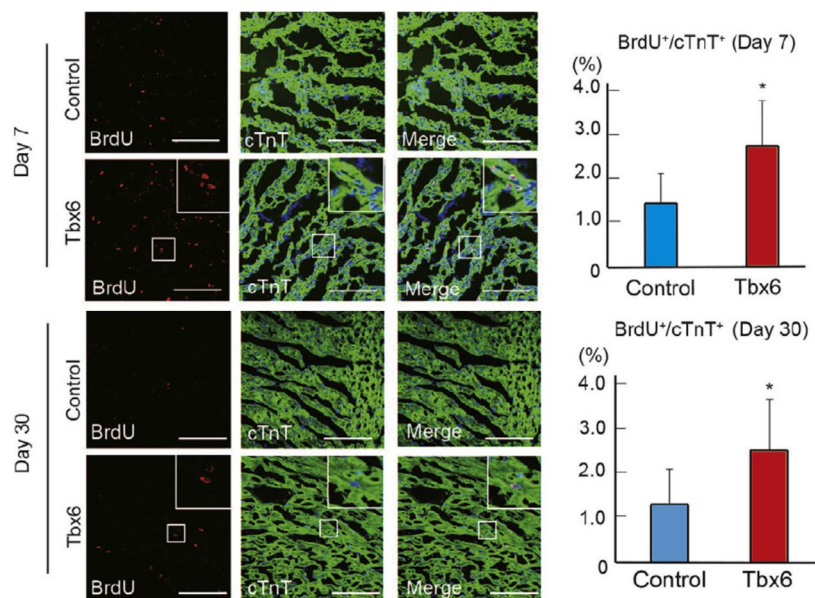


図 3: Tbx6 で細胞周期マーカーが増加

Expression ratio of cell cycle related genes in day 30 (Tbx6 vs control)

Cell cycle marker	Expression Ratio	Cell cycle activator	Expression Ratio	Cell cycle inhibitor	Expression Ratio
Aurka	1.9	Ccna1	1.2	Rb1	-4.9
Aurkb	1.3	Ccnb2	2.3		
Aurkc	1.3	Ccnb3	1.6		
Mki67	2.5				

図 4: Tbx6 が細胞周期レギュレーターの発現を変更

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sho Haginiwa
2. 発表標題 Identification of new myocardial growth factor and its application to cardiac regeneration
3. 学会等名 国際心臓研究学会（ISHR）日本部会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sho Haginiwa
2. 発表標題 Identification of new myocardial growth factor and its application to cardiac regeneration
3. 学会等名 The 2nd JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research（国際学会）
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----