

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08562

研究課題名(和文) miRNAを用いた効率的な心筋ダイレクトリプログラミング法の確立と分子基盤の解明

研究課題名(英文) Establishment of efficient myocardial direct reprogramming method using miRNA and elucidation of its molecular basis.

研究代表者

三井 薫 (Mitsui, Kaoru)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：40324975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：心筋直接分化誘導法の再生医療での実用化の大きな壁はその導効率の低さである。我々はこれまでに、新たな心筋分化促進因子を見出すため、心筋分化時の経時的な遺伝子発現変化を解析し、分化段階特異的に発現上昇するmiRNAを得た。本研究では、得られた心筋特異的miRNAによる心筋直接分化誘導の効率化とその分子基盤の解明を目指し研究に取り組んだ。線維芽細胞へ導入したところ、心筋関連遺伝子の発現が上昇するmiRNAが複数得られたが、心筋直接分化誘導を効果的に促進するまでには至らず、候補因子の絞り込みが予想以上に挑戦的な課題であった。今後はmiRNAの組み合わせなどを検討し、引き続き探索を進めていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本における心不全患者、特に急性心筋梗塞からの心機能低下による慢性心不全への移行は大きな問題となっており、治療法の開発が必要とされている。近年開発されたダイレクトリプログラミング法では、心筋分化促進因子を心臓へ導入することにより体内で体細胞から心筋細胞へ直接分化を促す“医薬”となり得ることから、心不全の治療法としても大きな期待が持たれているが、分化誘導効率の低さが実用化の大きな壁となっている。従って、生体内外における分化転換効率を十分に高める因子を探索する基礎研究を推進することが、ダイレクトリプログラミング法を用いた迅速な急性心筋梗塞治療、さらには心機能回復治療の発展につながる。

研究成果の概要(英文)：A major obstacle to the practical application of direct myocardial differentiation in regenerative medicine is its low efficiency. In order to identify new factors that promote myocardial differentiation, we have analyzed changes in gene expression over time during myocardial differentiation and obtained miRNAs that are upregulated specifically at differentiation stages. In this study, we aimed to improve the efficiency of direct induction of myocardial differentiation by the obtained myocardial-specific miRNAs and to elucidate the molecular basis of this induction. However, the miRNAs did not effectively promote the induction of direct cardiac differentiation, and narrowing down the candidate factors was more challenging than expected. In the future, we will examine combinations of miRNAs and continue our search.

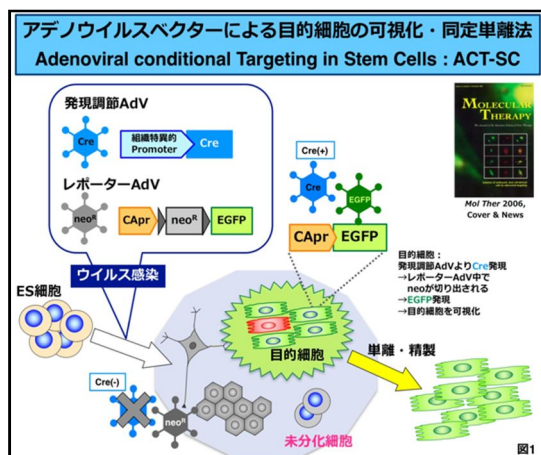
研究分野：再生医学

キーワード：心筋細胞 ダイレクトリプログラミング miRNA

### 1. 研究開始当初の背景

日本における心不全患者は増加傾向にあり、特に急性心筋梗塞からの心機能低下による慢性心不全への移行は、大きな問題となっており、この心機能低下を抑制する治療法の開発が必要とされている。その治療法の1つと目されるヒト多能性幹細胞からの心筋誘導は、時間やコストの面のみならず、腫瘍化(奇形腫、癌化)という大きな問題がある。近年、体細胞から別の(目的の)細胞へと直接誘導するダイレクトリプログラミング法が開発された。体細胞からの iPS 細胞の樹立や多能性幹細胞からの分化誘導というステップを経ないこと、さらには治療対象である臓器へリプログラミング因子を導入して体内でダイレクトリプログラミングを促す”医薬”となり得ることから、有効かつ安全な細胞ソースとしてだけでなく、再生能を持たない細胞・臓器疾患の治療法としても大きな期待が持たれている。しかし、特にヒト体細胞を用いたダイレクトリプログラミングによる分化誘導効率率は低く、これが実用化の大きな壁となっている。従って、生体内外における分化転換効率を十分に高める因子を探索する基礎研究を推進することが、ダイレクトリプログラミング法を用いた迅速な急性心筋梗塞治療、さらには心機能回復治療の発展につながるかと考えた。

これまでのリプログラミング因子探索のほとんどは、線維芽細胞(体細胞)と成熟心筋細胞との発現比較解析から得られた結果を元に候補因子を決定している。我々は、リプログラミング因子は心発生過程で機能する因子でもあることから、発生過程を模倣している多能性幹細胞から心筋細胞への分化過程において、経時的な遺伝子発現変化を解析することにより、心筋分化誘導を促進する新たな因子を見出すことが出来るのではないかと考えた。我々が開発した ACT-SC 法(図 1)は、二種類のアデノウイルスベクターを用いて Cre-loxP システムを応用し、どのような目的(分化)細胞でも、特異的に可視化し、確実に同定・単離する標準化技術である。これまでに、この ACT-SC 法を用いて単離した、ヒト ES 細胞より分化誘導した心筋前駆細胞ならびに成熟(拍動)心筋細胞について、DNA マイクロアレイ、およびマイクロ RNA (miRNA) マイクロアレイによる網羅的解析を行い、心筋前駆細胞および成熟心筋細胞に特異的な遺伝子や miRNA を得ていた。



### 2. 研究の目的

心筋ダイレクトリプログラミングは、創薬や再生医療の基盤ツールとして期待されているが、分化誘導効率が高いことが、全応用での最大の克服課題であり、生体内外における分化転換効率を十分に高める因子の探索が必要とされる。そこで、本研究では、これまでに多能性幹細胞から心筋細胞への分化過程での網羅的解析から得ていた結果から、遺伝子発現ネットワークを調節し発生制御において重要な役割を果たすとされている miRNA に着目し、心筋リプログラミング促進因子の同定を行い、心筋直接分化誘導の効率化とその分子基盤の解明を目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

我々が同定した心筋分化特異的 miRNA のうち、心筋分化初期および後期に特異的に発現が上昇した 46 の miRNA (ヒトおよびマウスホモログ)を候補因子として、ヒト線維芽細胞およびマウス胎仔線

維芽細胞やマウス心臓線維芽細胞へ導入し、心筋関連遺伝子の発現解析を行う。また、既報の心筋ダイレクトリプログラミング因子 Tbx5, MEF2C, GATA4, MESP1, MYOCD, miR-133(TMGM+miR133; Muraoka et al 2014)、あるいは miR-1, miR-133, miR-208 および miR-499(4miRNA) (Jayawardena et al 2012)に、心筋特異的 miRNA を加え、分化誘導効率を検証・評価する。また、細胞に導入する miRNA mimic による異なる心筋系統細胞(成熟心筋細胞、心房筋細胞、心筋細胞など)への分化の違い等について検討する。さらに、心筋直接分化誘導に効果が見られた miRNA mimic のターゲット遺伝子等について、解析を行い、心筋分化における miRNA の作用機序について検討する。

#### 4. 研究成果

##### 1) 心筋直接分化促進候補因子の同定

心筋直接分化促進候補因子である 46 の心筋分化特異的 miRNA を、ヒト線維芽細胞およびマウス胎仔線維芽細胞やマウス心臓線維芽細胞へ導入し解析を行ったところ、発現は低いものの心筋関連遺伝子の発現が上昇する miRNA が複数得られた。しかし、残念ながら、これまでのところ TMGM+miR133 あるいは 4miRNA と組み合わせた心筋直接リプログラミングで効果的に分化促進するまでには至らず、候補因子の絞り込みが予想以上に挑戦的な課題であった。今後は、心筋分化初期に発現が低下する miRNA に対応する inhibitorなどを組み合わせ、分化効率の更なる改善や、miRNA mimic/miRNA inhibitor のみで直接分化誘導が可能かどうか検討し、心筋直接リプログラミングを効果的に促進する miRNA について引き続き探索を進めていく。

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kaoru Mitsui, Tomoyuki Takahashi, Kanako Ide, Eriko Matsuda, Ken-Ichiro Kosai	4. 巻 541
2. 論文標題 Optimization of adenoviral gene transfer in human pluripotent stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 78-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.01.009	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0件

〔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
研究 分 担 者	小賤 健一郎  (Kosai Ken-ichiro)  (90258418)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授    (17701)	

	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
研究 協 力 者	井手 佳菜子  (Kanako Ide)		

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