

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22613

研究課題名（和文）加齢に伴う心筋リプログラミング抵抗性の分子機序解明と治療薬剤の開発

研究課題名（英文）Mechanism of cardiac reprogramming associated with aging

研究代表者

家田 真樹（Ieda, Masaki）

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：70296557

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：高齢化に伴い心臓病が増加しているが、新しい治療として心臓再生法の開発が求められている。心筋リプログラミング法は次世代の心臓再生法として期待されているが、我々は加齢に伴って心筋リプログラミング効率が低下することを新たに見出した。そこで本研究では、ケミカルスクリーニングを行い、加齢に伴う心筋リプログラミング抵抗性の分子機序解明とこれを改善する化合物を同定した。これにより安全で効率的な心筋リプログラミング法を確立でき、心臓再生医療の実現が大きく前進する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで加齢に伴う心筋リプログラミング抵抗性の分子機序を明らかにした報告は皆無であり、本研究は独創性・新規性の高い基礎研究であるだけでなく、心臓再生治療への応用という点で臨床的にも重要な研究である。我々はこれまで世界に先駆けて線維芽細胞の心筋リプログラミングに成功し、さらに加齢に伴う心筋リプログラミング抵抗性という現象を見出している。本研究はこれまで自らが積み上げてきた心筋リプログラミング研究の多くの知見や材料を利用するため、他より圧倒的に優位な立場で研究を進められる。また本研究成果は加齢に伴う線維化亢進の分子機構や抗線維化治療など他臓器にも一般化できる内容であり、大きな波及効果を期待できる。

研究成果の概要（英文）：Cardiac disease is increasing with aging, and the development of a heart regeneration method is required as a new treatment. Therefore, in this study, chemical screening was performed to determine the molecular mechanism of age-related myocardial reprogramming resistance and new compounds that can improve it. This will enable the establishment of a safe and efficient myocardial reprogramming method, which will greatly advance the realization of cardiac regenerative medicine.

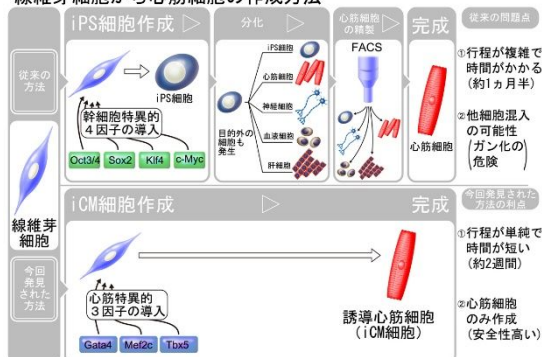
研究分野：循環器内科

キーワード：心臓再生

### 1. 研究開始当初の背景

高齢化に伴い心臓病が増加しているが、新しい治療として心臓再生法の開発が求められている。近年 iPS 細胞の発見により複数の組織特異的転写因子を導入して、ある細胞を別の細胞に直接転換する細胞リプログラミング研究が注目されるようになった。我々は世界に先駆けて心筋リプログラミング研究に着手し、これまでに心筋特異的な 3 つの転写因子 (Gata4, Mef2c, Tbx5) を導入すると、線維芽細胞が心筋細胞に直接リプログラミングすることを世界で初めて発見した (Ieda et al, Cell, 2010) (図 1)。またヒト細胞では、Gata4, Mef2c, Tbx5 に 2 遺伝子 (Mesp1, Myocd) を加えた 5 因子などで心筋リプログラミングできることなどを報告してきた (Wada et al, PNAS 2013, Muraoka et al, EMBO J 2014, Yamakawa et al, Stem Cell Reports 2015)。さらに、心筋リプログラミング遺伝子を発現するセンダイウイルスベクターを開発し、ゲノムに外来遺伝子の挿入なく安全に心筋リプログラミング効率を改善し、生体内心筋リプログラミングにより心筋梗塞モデルマウスで心臓再生に成功した (Miyamoto et al, Cell Stem Cell, 2018)。また最近では心臓中胚葉細胞を直接誘導する遺伝子として Tbx6 を新たに同定し、本研究領域を先導してきた (Sadahiro et al, Cell Stem Cell, 2018 表紙に掲載)。

線維芽細胞から心筋細胞の作成方法



(図 1) 線維芽細胞からの心筋作製法

iPS 細胞を経由した心筋作製法 (上段)

心筋リプログラミングによる新しい心筋作製法 (下段)

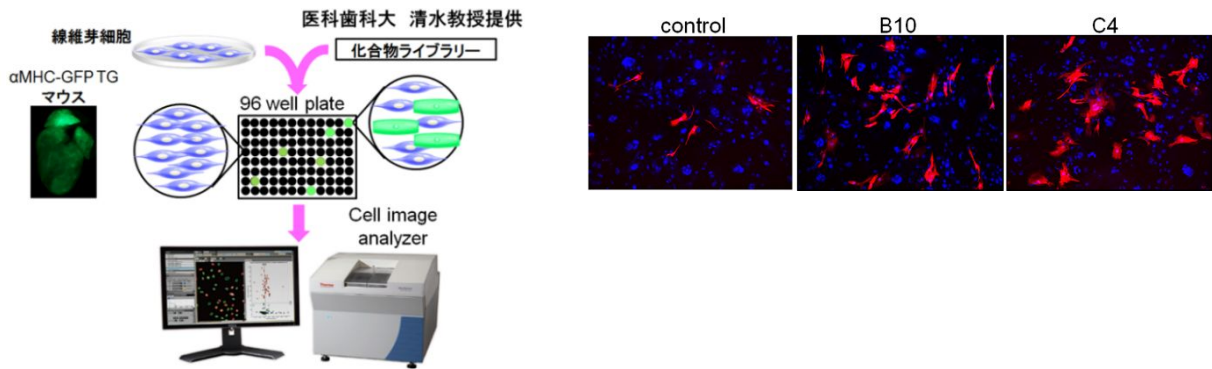
### 2. 研究の目的

心筋リプログラミング法は次世代の心臓再生法として期待されているが、我々は加齢に伴って心筋リプログラミング効率が低下することを新たに見出した。そこで本研究では、ケミカルスクリーニングを行い、加齢に伴う心筋リプログラミング抵抗性の分子機序解明とこれを改善する化合物を同定する。これにより安全で効率的な心筋リプログラミング法を確立でき、心臓再生医療の実現が大きく前進する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 加齢に伴う心筋リプログラミング抵抗性を改善する化合物のスクリーニング

我々はこれまでに、胎児期線維芽細胞に比べて、新生児および成体マウスの線維芽細胞からの心筋リプログラミングが低下することを見出している。そこで成体マウス線維芽細胞を用いて心筋リプログラミングを改善する化合物のスクリーニングを行う。ヒット化合物の同定は 2010 年に心筋リプログラミング因子を同定した時と同様に、心筋に転換すると蛍光を発する、MHC-GFP トランスジェニックマウス線維芽細胞を用いて、Cell Image Analyzer でハイスループットスクリーニングを行う。本研究では、研究協力者で化合物専門家である東京医科歯科大の清水教授から 10000 種類の化合物ライブラリーを供与していただき、網羅的にスクリーニングする。これまでの実験で、8400 化合物のスクリーニングを完了し、そのうちの機能未知を含んだ 4 化合物により成体線維芽細胞からの心筋リプログラミングが改善することを見出した (図 2)。



## (図2) 化合物ライブラリーを用いたスクリーニング

(左) MHC-GFP TG マウス細胞を用いた心筋リプログラミング促進化合物の網羅的スクリーニング (右) 複数の化合物で心筋リプログラミングが改善

### (2) 加齢に伴う心筋リプログラミング抵抗性を改善する化合物の同定

次に、各年齢のマウス線維芽細胞を用いて、上記ヒット化合物による心筋リプログラミング促進が加齢性変化に依存するか決定する。心筋誘導効率は定量性の高いFACSによるMHC-GFP、cardiac TnT 蛋白の発現や拍動心筋細胞数をカウントして決定する。これまでの実験で4化合物の中の1化合物で、加齢に伴う心筋リプログラミング抵抗性を改善する化合物を見出した。

### (3) 加齢に伴う心筋リプログラミング抵抗性の分子機序解明

ヒット化合物による心筋リプログラミング抵抗性改善の分子基盤を明らかにする。これまでの実験で、化合物添加による遺伝子発現をアレイで解析し、変化遺伝子群をGO term 解析やPathway 解析で評価した。その結果、加齢に伴う心筋リプログラミング抵抗性に新規のシグナル伝達物質が関与することを見出した。さらに同シグナル経路と心筋遺伝子領域のエピジェネティック変化が関連することをATAC-seq 解析で見出しており、詳細に分子機序を解明した。

## 4. 研究成果

### (1) ジクロフェナクが線維芽細胞での心筋誘導を促進することを発見スクリーニング

MHC-Cre/tdTomato マウス由来の新生児期線維芽細胞に、リプログラミング因子を遺伝子導入し、8400種の化合物ライブラリーを用いて心筋誘導促進化合物をスクリーニングした。スクリーニングの結果、新生児期線維芽細胞から心筋誘導を促進する4種の化合物を同定した。さらにスクリーニングを進めた結果、非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)として知られるジクロフェナクを添加することで、有意な心筋誘導が促進されることが明らかとなった。Gata4/Mef2c/Tbx5/Hand2(GHMT)にジクロフェナクを添加することで、心筋特異的タンパク質や遺伝子発現は上昇し、心筋特異的な横紋筋構造の明瞭化を認めた。またより成熟した心筋の特徴である自律的拍動を示す心筋細胞も約4倍に増加しており、ジクロフェナクにより心筋細胞の誘導が促進されるだけでなく、誘導された心筋細胞の成熟も促進されることが示された。ジクロフェナク投与による細胞毒性は認めず、ジクロフェナク投与期間が心筋誘導初期でのみ有効であることから、誘導促進の機序として、誘導初期でリプログラミングを促進していることが示唆された。

### (2) ジクロフェナクが心筋誘導を促進するメカニズムの解明

興味深いことに、ジクロフェナクによる心筋誘導促進効果は新生児期/成体期線維芽細胞に特異的であり、従来の胎児線維芽細胞では促進効果を認めなかった。我々は線維芽細胞が加齢に伴い、アラキドン酸カスケードのシクロオキシゲナーゼ(COX)-2やプロスタグランジン E2(PGE2)、PGE2 受容体の EP4 のシグナル発現が亢進することを明らかにし、ジクロフェナクによる COX-2 阻害が、誘導促進の機序であると仮説を立てた。その後の検討により、加齢とともに活性化される線維芽細胞における、COX-2/PGE2/EP4/IL-1 /IL-1R1 の経路が心筋誘導を抑制していることを明らかにし、ジクロフェナクはこの経路を抑制することで心筋誘導を促進させることを示した。

### (3) 心筋誘導を促進する細胞外基質の硬さと化合物の同定

細胞外基質の硬さにより心筋誘導が変化する分子メカニズムを解析した。まず同種類のハイドロゲルを用いて作成した 8kPa と 126kPa の細胞外基質上で、心筋誘導遺伝子 (Gata4, Mef2c, Tbx5, Hand2) の導入による線維芽細胞から心筋誘導を行い、遺伝子発現変化を網羅的に解析した。その結果、心臓と同等の柔らかさの 8kPa の細胞外基質では、足場からの機械的刺激を細胞内に伝達するインテグリンシグナル、その下流の転写調節因子である YAP および TAZ 遺伝子、線維化関連遺伝子の発現が抑制されており、それに伴い心筋誘導が上昇していました。一方、骨と同等の硬さの 126kPa の細胞外基質では、機械的刺激を伝達するインテグリン、Rho/ROCK、ミオシン、YAP/TAZ 遺伝子、さらに線維化遺伝子の発現が上昇しており、心筋誘導が低下していました。またポリスチレン製の培養皿では、126kPa の細胞外基質と同様に、インテグリン、YAP/TAZ 遺伝子や線維化関連遺伝子の発現が上昇しており、心筋誘導が低下していました。これに対して、126kPa の細胞外基質やポリスチレン製の培養皿上で活性化するインテグリン、Rho/ROCK、ミオシンを直接阻害する薬剤や、YAP および TAZ 遺伝子の発現を抑制することで、心筋誘導効率が改善することを解明した。

### (4) 今後の展開

これまで加齢に伴う心筋リプログラミング抵抗性の分子機序を明らかにした報告は皆無であり、本研究は独創性・新規性の高い基礎研究であるだけでなく、心臓再生治療への応用という点で臨床的にも重要な研究である。我々はこれまで世界に先駆けて線維芽細胞の心筋リプログラミングに成功し、さらに加齢に伴う心筋リプログラミング抵抗性という現象を見出している。本研究はこれまで自らが積み上げてきた心筋リプログラミング研究の多くの知見や材料を利用するため、他より圧倒的に優位な立場で研究を進められる。また本研究成果は加齢に伴う線維化亢進の分子機構や抗線維化治療など他臓器にも一般化できる内容であり、大きな波及効果を期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kurotsu Shota, Sadahiro Taketaro, Harada Ichiro, Ieda Masaki	4. 巻 3
2. 論文標題 A biomimetic hydrogel culture system to facilitate cardiac reprogramming	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 101122 ~ 101122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2022.101122	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, Ieda Masaki	4. 巻 122
2. 論文標題 In vivo reprogramming as a new approach to cardiac regenerative therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Seminars in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 21 ~ 27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.semldb.2021.06.019	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 Isomi Mari, Sadahiro Taketaro, Fujita Ryo, Abe Yuto, Yamada Yu, Akiyama Tatsuya, Mizukami Hiroaki, Shu Tsugumine, Fukuda Keiichi, Ieda Masaki	4. 巻 560
2. 論文標題 Direct reprogramming with Sendai virus vectors repaired infarct hearts at the chronic stage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 87 ~ 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.04.121	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 Sadahiro Taketaro, Ieda Masaki	4. 巻 69
2. 論文標題 Direct Cardiac Reprogramming for Cardiovascular Regeneration and Differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Keio Journal of Medicine	6. 最初と最後の頁 49 ~ 58
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 IEDA MASAKI	4. 巻 26
2. 論文標題 Key Regulators of Cardiovascular Differentiation and Regeneration: Harnessing the Potential of Direct Reprogramming to Treat Heart Failure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cardiac Failure	6. 最初と最後の頁 80 ~ 84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cardfail.2019.09.005	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, Ieda Masaki	4. 巻 69
2. 論文標題 Direct Cardiac Reprogramming for Cardiovascular Regeneration and Differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Keio Journal of Medicine	6. 最初と最後の頁 49 ~ 58
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Haginiwa Sho, Sadahiro Taketaro, Kojima Hidenori, Isoni 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 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 14件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Masaki Ieda
2. 発表標題 Cardiac reprogramming and regeneration
3. 学会等名 5th International Forum on Medical Innovation of Cell & Bio Therapy (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masaki Ieda
2. 発表標題 Converting scar tissue to heart muscle after a heart attack
3. 学会等名 2021 Annual Spring Scientific Conference of the Korean Society of Cardiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 家田真樹
2. 発表標題 Cardiac Fibrosis, Reprogramming, and Regeneration
3. 学会等名 第86 回日本循環器学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 家田真樹
2. 発表標題 ダイレクトリプログラミングによる新しい心臓再生法の開発
3. 学会等名 武蔵野大学・人間科学研究所シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 家田真樹
2. 発表標題 心臓再生医療の現状と展望 ダイレクトリプログラミングによる心臓再生
3. 学会等名 第25回日本心不全学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masaki Ieda
2. 発表標題 Direct reprogramming for Cardiac Regeneration
3. 学会等名 ISHR Asia-Pacific Cardiovascular Webinar（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masaki Ieda
2. 発表標題 DIRECT REPROGRAMMING INTO CARDIOVASCULAR LINEAGES
3. 学会等名 ISSCR 2020 annual web meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 家田真樹
2. 発表標題 YAP/TAZ and Fibrosis: New Link between Cardiac Reprogramming and Mechanobiology
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 家田真樹
2. 発表標題 ダイレクトリプログラミングを用いた心筋再生
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 家田真樹
2. 発表標題 心筋リプログラミング研究の新しい展開
3. 学会等名 第24回日本心不全学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masaki Ieda
2. 発表標題 Making New Muscle Cells from Fibroblasts for Heart Regeneration
3. 学会等名 The KAST-NAMOK joint International Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaki Ieda
2. 発表標題 Direct Reprogramming for Cardiovascular Regeneration
3. 学会等名 CSSCR annual session (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaki Ieda
2. 発表標題 Direct reprogramming and cardiovascular research
3. 学会等名 AHA BCVS 2019 Scientific Sessions Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaki Ieda
2. 発表標題 Direct Reprogramming toward Cutting-edge Cardiovascular Research
3. 学会等名 Gwangju-International Interventional Cardiology Symposium (招待講演) (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
---------	---------