

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17095

研究課題名（和文）心筋ダイレクトリプログラミングによる成熟型心筋細胞の作成と分子機構の解明

研究課題名（英文）Generation of mature induced-cardiomyocytes by direct cardiac reprogramming and elucidation of their molecular mechanisms

研究代表者

児島 秀典（Kojima, Hidenori）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・共同研究員

研究者番号：10645766

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）：我々は活性型Mef2cを用いた心筋リプログラミングで拍動する誘導心筋（induced cardiomyocytes: iCM）が増加し、それらは形態的、機能的、遺伝子発現から成熟した心筋細胞に近いことを見出した。活性型Mef2cでiCMの成熟の分子メカニズムとして、ヒストンアセチル化酵素p300が関与することを発見した。活性型Mef2cによってp300が心臓関連遺伝子の転写制御領域に誘導され、エピジェネティックなリプログラミングを起こし、心臓関連因子を動員することで成熟iCMの心筋リプログラミングを促進していることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋ダイレクトリプログラミングは心臓病治療の有望な治療法となりうるが、完全にリプログラミングされ自律拍動を呈する機能的なiCMの効率は低く、その分子メカニズムも不明である。これらは臨床応用に向けて障害の一つとなっている。

本研究は、活性型Mef2cにより誘導されたiCMが多角的に成熟であり、その分子メカニズムにp300を介したエピジェネティックなリプログラミングが関与していることを発見した。これらの成果は心筋リプログラミングの臨床応用のみならず、心臓発生や他領域のリプログラミングの分子メカニズムの解明の一助になると思われる。

研究成果の概要（英文）：In direct cardiac reprogramming, the efficiency of generation of functional induced-cardiomyocytes (iCM), which are fully reprogrammed and exhibit spontaneous contraction, is low and the molecular mechanisms are unclear. These are one of the obstacles to the clinical application of cardiac reprogramming.

We found that the utilization of activated Mef2c promotes the induction of beating mature iCM, which were morphologically, functionally, and transcriptionally similar to mature cardiomyocytes. Then, we clarified that histone acetyltransferase p300 is involved in the maturation of iCM by active Mef2c. p300 is recruited by active Mef2c to the transcriptional regulatory regions of heart-related genes, evokes epigenetic reprogramming, and cooperates with heart-related factors to promote the maturation of iCM in cardiac reprogramming.

研究分野：再生医療

キーワード：心筋リプログラミング 再生医療 心筋細胞 成熟

1. 研究開始当初の背景

現代においても心臓病は主要な死因であり、特に重症心不全においては心移植以外の有用な治療法はない。本邦においてのドナー不足は深刻で心移植の代替となる治療法は開発されていない。今後、心臓病罹病率の増加がより深刻となることが予想され、心臓再生医療の開発が急務である。心臓病の本態は、機能的な心筋細胞の喪失と線維芽細胞の増生・病的線維化による機能障害である。我々の研究室は、線維芽細胞を直接的に心筋細胞に転換する心筋ダイレクトリプログラミングを世界に先駆け報告し (Ieda. Cell. 2010; 142(3): 375-86)、これは心筋細胞喪失・病的線維化を同時に解決できる有望な手法と考えられる。しかし、心筋ダイレクトリプログラミングでの誘導心筋 (induced cardiomyocytes : iCM) が完全にリプログラミングされ自律拍動を呈する効率は低く、また iCM 自体は未成熟な心筋細胞とされている (Cahan. Cell. 2014; 158(4):903-915.)。しがたがって、成熟した iCM の作成とその分子機序の解明が臨床応用へ向けて克服すべき課題の一つである。

特に、iPS 細胞の作成や神経細胞などの他の細胞種のリプログラミングにおいても、エピジェネティックなリプログラミングの重要性が報告されている。ヒト細胞でのリプログラミングにおいてエピジェネティクスの障壁が低効率の原因の一つとされており、エピジェネティクスの解明も必要と考えられる。

2. 研究の目的

最小の心筋リプログラミング因子の組み合わせ GMT (Gata4: G, Mef2c: M, Tbx5: T) に追加因子を加えることなく成熟した iCM の誘導する方法の解明と、その分子機序の解明を目的とした。心筋リプログラミングは GMT で達成できるが、拍動する機能的な iCM まで完全リプログラミングされる効率は低く、さらなる追加因子の導入により iCM の成熟が促進されることが報告されている。臨床応用に際して、因子が少ない方が同一細胞に同時に因子導入できる確率・リプログラミング効率が上がるメリットや、分子機序の解明においてもより単純化しやすいと思われた。

- (1) 検証済みの活性型 Mef2c を用いると拍動する iCM が増加することを確認したが、それらと成熟心筋細胞に近い多角的に評価を行う
- (2) 活性型 Mef2c で拍動 iCM が増加する分子メカニズムを検証する

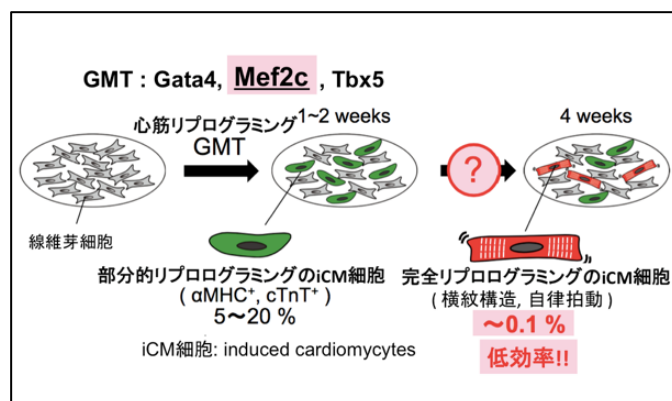


図 1 完全リプログラミングの効率は低く、その分子メカニズムも不明である

3. 研究の方法

GT と活性型 Mef2c での心筋リプログラミングで拍動する iCM が増加することを既に確認している。

- (1) 通常 Mef2c と活性型 Mef2c での iCM を比較し、心筋細胞の成熟度の評価を行う
 - ① 形態学的
 - ② 機能的
 - ③ 遺伝子発現
- (2) 活性型 Mef2c で成熟 iCM が誘導される分子メカニズムを検証する
 - ① 活性型 Mef2c と共役する因子の探索
 - ② 探索された因子の確らしさの検証
 - ③ 探索された因子のリプログラミングでの作用の検証
 - ④ 探索された因子の過剰発現・抑制による影響の検証

4. 研究成果

(1)

① 免疫染色によりサルコメア構造・細胞サイズを評価し、さらに免疫染色・電子顕微鏡を用いて T 管構造が活性型 Mef2c でのみ形成されることを確認した (図 2)。

② 拍動する iCM が増加していることに加えて、活動型 Mef2c を用いると Ca 電流を呈する細胞が増加し、ベラパミルやイソプロテレノールでの薬剤応答が成熟心筋細胞と似た反応を示すことを確認した。

③ Microarray、RNA sequence での網羅的遺伝子解析を行った。活性型 Mef2c での iCM で発現上昇している遺伝子群の機能解析では心筋細胞、心臓発生にかかわる遺伝子群であった。主成分解析や GSEA などで活性型 Mef2c での iCM は通常 Mef2c での iCM に比べて、マウス胎児心筋よりマウス成獣心筋に近いことを確認した。

以上より、活性型 Mef2c で誘導される iCM は形態学的、機能的、遺伝発現的により成熟心筋に近い成熟した iCM であることが示された。

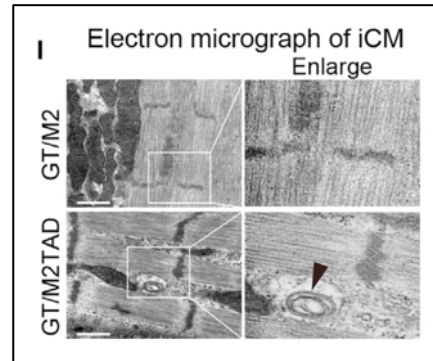


図 2 T 管形成を確認した

(2)

① ② マイクロアレイ解析で活性型 Mef2c での iCM で発現が亢進している遺伝子群を制御している因子を ChIP Atlas enrichment 解析で探索したところエピジェネティクスに関与するヒストンアセチル化酵素 p300 の関与が示唆された。さらに、心臓発生に重要な転写因子 Nkx2-5、Srf の標的遺伝子群の発現が活性型 Mef2c での iCM で上昇していることを確認した。

実際の心筋細胞において GMT、Nkx2-5、Srf の各転写因子と p300 などの ChIP sequence を解析し、活性型 Mef2c での iCM で発現上昇している遺伝子群のプロモーター領域で enrichment していることを確認した (図 3)。また、p300 の ChIP sequence の Motif 解析では MEF2C が上位に検出された。

そこで、活性型 Mef2c が p300 を recruit し、さらに他の心臓関連因子を誘導し心筋リプログラミングを促進しているという仮説を立てた。

③ ④ 心筋リプログラミングで p300 の過剰発現、ノックダウンを行い検証した。通常 Mef2c でのリプログラミングで p300 の過剰発現・ノックダウンは iCM の成熟には影響がなかった。一方、活性型 Mef2c では p300 のノックダウンで iCM の成熟が抑制されるが、過剰発現では影響がなかった。また、p300 や H3K27ac の ChIP qPCR で活性型 Mef2c での iCM でのみ p300 の関与を確認し、活性型 Mef2c と p300 との co-IP で直接的な相互作用を確認した。

これらの結果より、活性型 Mef2c での iCM の成熟において心筋関連の遺伝子制御領域への p300 の recruitment がエピジェネティックなリプログラミングを誘導し、心筋プログラミングでの iCM の成熟を促進すると結論づけた。

以上の得られた知見を統合し、*Stem Cell Reports* 誌に論文報告を行った (図 4)。

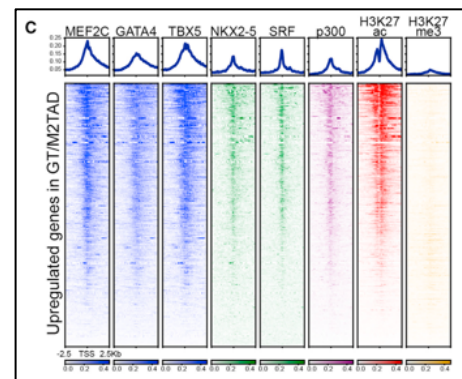


図 3 心筋細胞で GMT・NKX2-5・SRF と p300 が関与していることが示唆された

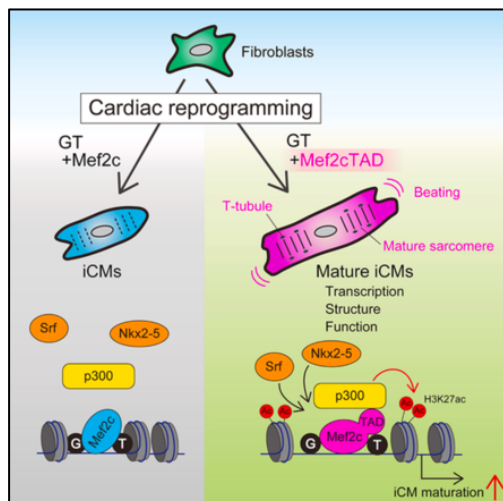


図 4 活性型 Mef2c で iCM 成熟のまとめ

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 Hidenori Kojima, Taketaro Sadahiro, Naoto Muraoka, Hiroyuki Yamakawa, Hisayuki Hashimoto, Ryota Ishii, Masahiko Goshō, Yuto Abe, Yu Yamada, Koji Nakano, Seiichiro Honda, Ryo Fujita, Tatsuya Akiyama, Yoichi Sunagawa, Tatsuya Morimoto, Toshifumi Tsukahara, Hiroyuki Hirai, Keiichi Fukuda, and Masaki Ieda	4 . 巻 18
2 . 論文標題 MEF2C/p300-mediated epigenetic remodeling promotes the maturation of induced cardiomyocytes	5 . 発行年 2023年
3 . 雑誌名 Stem Cell Reports	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） なし	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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------