

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21890117

研究課題名(和文) 遺伝子導入による心血管前駆細胞リプログラミングを用いた画期的心臓再生療法の確立

研究課題名(英文) Innovation of the novel cardiac regeneration therapy using gene introduction-mediated cell conversion into cardiac progenitor cells.

研究代表者

川村 晃久 (KAWAMURA TERUHISA)

京都大学・生命科学系キャリアパス形成ユニット・助教

研究者番号：90393199

研究成果の概要(和文)：

重症心不全に対して、人工多能性幹(iPS)細胞を用いた心臓再生療法が期待されている一方で、低分化効率や移植後腫瘍形成などの問題点も懸念されている。そこで、本研究では、遺伝子を導入することで心臓内の繊維芽細胞を心筋(前駆)細胞へ転換することで心機能の回復を試みる新規心臓再生療法の確立を試みた。繊維芽細胞から iPS 細胞へのリプログラミングのメカニズム研究により、繊維芽細胞を直接的に心筋(前駆)細胞へ転換する方法の開発に成功した。さらに、この手法の効果確認のためのマウス心不全モデルを用いた準備的実験系を構築した。

研究成果の概要(英文)：

Recent technologies to reprogram somatic cells into induced pluripotent stem (iPS) cells have been expected as a powerful tool of regeneration therapy for end-staged heart failure. However, duration of iPS cell derivation and the risk of tumorigenesis including teratoma after cell implantation as well as limited efficiency for cardiac differentiation are considered as great barriers against the clinical application of this powerful approach. To overcome these problems, by modifying the reprogramming process, here we show the novel alternative strategy which enables us to create cardiac myocytes directly from fibroblasts rapidly and efficiently with a low risk of tumorigenesis. In addition, we established the mouse experimental model to evaluate the effect of this strategy as an innovative cardiac regeneration therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：循環器内科学

キーワード：分子心臓病態学、再生医学、幹細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

重症末期心不全の特徴として、細胞死による残存心筋細胞数の低下と繊維化に伴う非心筋細胞の増加があげられる。分裂能を喪失した成人心筋細胞は、虚血や圧負荷などによる病的ストレスに対して自己再生能力が乏しいためである (*N Engl J Med.* 1999; 341:1276-1283.)。このような背景から、心筋細胞を新たに作り出し不全心内へ移植し補うことを目的とした心筋再生療法が、これまで数多く提案されてきた (*Circ J* 2008; Suppl A:A-49-A-55.)。移植する心筋細胞としては、拒絶反応の起こらない自己の骨髄間質細胞、造血幹細胞、末梢血内皮前駆細胞、骨格筋芽細胞及び心臓内心筋前駆細胞由来の細胞が候補であったが、生体内の自己組織幹細胞は採取効率が悪く体外での大量培養も技術的、医療経済的にも問題がある。一方で、胚性幹 (ES) 細胞は無限の自己複製能と多分化能を有し、比較的高率に心筋細胞へ分化する (*FASEB J.* 2003;17:740-742.、**研究業績 5, 8**)。さらに、近年、京都大学・山中伸弥教授によって樹立された人工多能性幹 (iPS) 細胞 (*Cell.* 2006;126:663-676. *Cell.* 2007;131:861-872.) は、ES 細胞と同様の性質を保持し、細胞移植に伴う拒絶反応が起こらないこと、樹立に伴う倫理的問題を回避できることから、再生医療に用いる移植細胞のソースとして、全世界的にその実用化が大きく期待されている。しかしながら、iPS 細胞は癌遺伝子を含む複数の転写因子を強制発現させて作成されており、これに起因する癌化の問題 (*Nature.* 2007;448:313-317.) が懸念されている。また、心筋細胞への分化効率が樹立された株間で異なること (Kaichi S, Kawamura T et al. *Circ Res in revision*)、分化誘導後に純度の高い心筋細胞を採取することが困難であること、あるいは、移植後の生着率の低さといった数多くの問題点が残されている。

2. 研究の目的

上記の研究背景をもとに、ES や iPS 細胞のもつ大きな問題点である、癌化・低純度心筋細胞採取効率・低い移植時生着効率などをすべて解決する革新的再生療法を着想するに至った。すなわち、本申請研究では、「iPS 細胞へのリプログラミング誘導過程」と「ES あるいは iPS 細胞から心筋分化誘導過程」に関する両解析から得られた分子機序をうまく組み合わせることで、繊維芽細胞などの体細胞から直接的に心血管前駆細胞を誘導する因子群を同定し (図 1a)、これらを不全心内へ遺伝子導入することで *in vivo* で心筋細胞や血管構成細胞を誘導し心臓再生を試みる (図 1b)。これらの問題を解決するために、本研究の目

的は、ウイルスベクターを用いて不全心内に存在する繊維芽細胞に直接遺伝子を導入し、これらの細胞を心筋(幹・前駆)細胞に転換することによって心機能の回復を試みる画期的心血管再生療法の確立である。

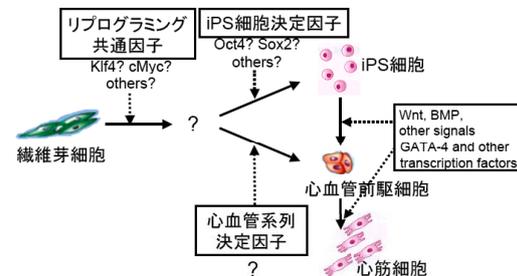


図 1a. iPS 細胞および心血管前駆細胞へのリプログラミング

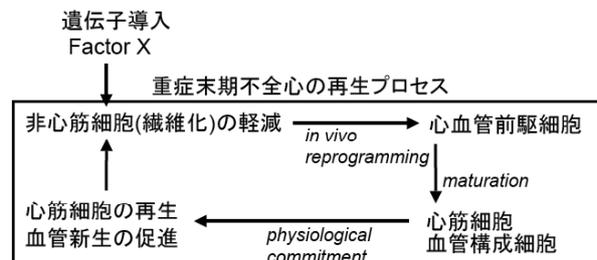


図 1b. 新規心臓再生療法モデル

3. 研究の方法

非心筋細胞を心血管前駆細胞にリプログラミングする遺伝子の探索を *in vitro* の培養系で行う。「ES あるいは iPS 細胞の心血管分化機構に関する解析」や「iPS 細胞へのリプログラミングの基礎的なメカニズム解析」から得られた知見をうまく組み合わせることで、候補遺伝子群を同定し、実際にこれらを発現させることで、非心筋細胞が心血管前駆細胞にリプログラミングされるかどうかを検討する。次に、候補遺伝子によるリプログラミングの効果を *in vivo* の不全心内で検証する。心筋梗塞やその他の方法でマウスに心不全を作成し、ウイルスベクターによって候補遺伝子を発現させることで非心筋細胞が心血管系前駆細胞へ形質転換され最終的に心筋細胞あるいは心臓内血管構成細胞へ成熟し機能的に生着するかどうか、また、これに伴い不全心の心機能が改善されるか否かを検証する。

4. 研究成果

(初年度)

成果 1 : iPS 細胞誘導と心筋(幹・前駆)細胞へ

の形質転換に関わる共通した分子機序の解明

iPS細胞形成過程においても、心筋細胞分化と同様に、ヒストンアセチル化酵素である核内転写転写因子コファクターp300が重要であることを確認した。さらに、初期化誘導過程で、iPS細胞になりやすい細胞群とそうでない群があること、さらに、初期化過程の早期段階ですでに心筋細胞へ分化する細胞が存在することをつきとめた。これらの成果から、p300を適切な時期に強制発現させたり、初期化過程の特定の細胞に心筋特異的転写因子を発現させることで繊維芽細胞を心筋(および幹・前駆)細胞へ形質転換できる可能性が期待される。

成果2：培養細胞レベルにおける心血管前駆細胞リプログラミング誘導候補因子の絞込み

心筋特異的転写因子など候補遺伝子の種々の組み合わせの中から、心筋細胞特異的レポーターが発現する細胞を誘導することに成功した。これらの細胞を分離し特性解析を行うことで形質転換効率を高めることが出来れば、心臓再生を促す新たな遺伝子治療の開発基盤となると期待される。

(次年度：最終年度)

成果1：iPS細胞誘導と心筋(前駆)細胞への形質転換に関わる共通した分子機序の解明

iPS細胞誘導(=初期化)過程の解析から、初期化の成功・不成功の運命決定が比較的早期になされていることが判明した。遺伝子発現解析から、特定のマーカー分子の発現の有無によりiPS細胞になりやすい細胞群とそうでない群を同定することに成功した。興味深いことに、iPS細胞になりにくい細胞群から心筋細胞へ効率的に分化誘導することに成功した(図2)。これらの結果は、初期化誘導過程では、iPS細胞以外にも心筋前駆様細胞が誘導されることを示唆している。網羅的遺伝子発現解析から、繊維芽細胞をより効率的に十分量の心筋(および幹・前駆)細胞へ形質転換できる因子の探索を施行した。

成果2：心筋前駆細胞への転換誘導因子の改良

心筋特異的転写因子など候補遺伝子の種々の組み合わせの中から、心筋細胞特異的レポーターが発現する細胞を誘導することに成功した。しかし、形質転換効率が低いため、上記テーマの結果をもとに、因子の改良を試みた。同時に、マウス心筋梗塞モデルを立ち

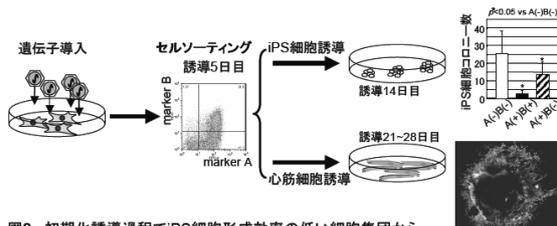


図2. 初期化誘導過程でiPS細胞形成効率の低い細胞集団から、自己拍動するトロポニン陽性心筋細胞の誘導に成功した。自己拍動する心筋細胞

上げ、不全身への遺伝子導入の系の立ち上げも準備しており、今後の研究へ発展させていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件、すべて査読あり)

- 1) Nishi H, Ono K, Horie T, Nagao K, Kinoshita M, Kuwabara Y, Watanabe S, Takaya T, Tamaki Y, Takanabe-Mori R, Wada H, Hasegawa K, Iwanaga Y, **Kawamura T**, Kita T, Kimura T. MicroRNA-27a regulates beta cardiac myosin heavy chain gene expression by targeting thyroid hormone receptor betal in neonatal rat ventricular myocytes. *Mol Cell Biol.* 2011;31:744-755.
- 2) Kaichi S, Takaya T, Morimoto T, Sunagawa Y, **Kawamura T**, Ono K, Shimatsu A, Baba S, Heike T, Nakahata T, Hasegawa K. Cyclin-dependent kinase 9 forms a complex with GATA4 and is involved in the differentiation of mouse ES cells into cardiomyocytes. *J Cell Physiol.* 2011;226:248-254.
- 3) Kaichi S, Hasegawa K, Takaya T, Yokoo N, Mima T, **Kawamura T**, Morimoto T, Ono K, Baba S, Doi H, Yamanaka S, Nakahata T, Heike T. Cell line-dependent differentiation of induced pluripotent stem cells into cardiomyocytes in mice. *Cardiovasc Res.* 2010;88:314-323.
- 4) Sugii S, Kida Y, **Kawamura T**, Suzuki J, Vassena R, Yin YQ, Lutz MK, Berggren WT, Izpisua-Belmonte JC, Evans RM. Human and mouse adipose-derived cells support feeder independent induction of pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:3558-3563.
- 5) **Kawamura T**, Suzuki J, Wang YV, Menendez S, Battle Morera L, Raya A, Wahl GM, Izpisua-Belmonte JC. Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature.* 2009;460:1140-1144.
- 6) Takaya T, Ono K, **Kawamura T**, Takanabe R, Kaichi S, Morimoto T, Wada H, Kita T, Shimatsu A, Hasegawa K. MicroRNA-1 and MicroRNA-133 in spontaneous myocardial differentiation of mouse embryonic stem cells.

Circ J. 2009;73:1492-1497.

〔学会発表〕(計6件)

1) **川村晃久** iPS細胞誘導過程における細胞運命決定機構を探る CKDと心血管イベントExpert Meeting V(招待講演)、平成22年7月10日、東京

2) Sogo T, Takaya T, Shigeno A, Kojima Y, Hasegawa K, **Kawamura T.** Efficient creation of induced pluripotent stem cells for myocardial regeneration therapy. 2010 World Heart Federation, Jun 19th 2010, Beijing, China

3) Shigeno A, Sogo T, Takaya T, Kojima Y, Hasegawa K, **Kawamura T.** Role of Wnt signaling in cardiac differentiation from mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. 2010 World Heart Federation, Jun 18th 2010, Beijing, China

4) **Kawamura T** and Suzuki J. p53 tumor suppressor pathway as a novel checkpoint during somatic cell reprogramming. 第9回再生医療学会(招待シンポジスト)、平成22年3月18日、広島

5) **Kawamura T,** Jotaro Suzuki J, Wahl GM, Izpisua-Belmonte JC. Links between p53 tumor suppressor pathway and somatic cell reprogramming. 第32回分子生物学会年会(ワークショップ)、平成21年12月9日、横浜

6) **Kawamura T.** The p53 pathway as a guardian against reprogramming. The 5th China-Japan Cardiovascular Forum (招待講演), Oct 12th 2009, Beijing, China

〔図書〕(計1件)

川村晃久、十河孝浩、メディカルレビュー社、アンチ・エイジング医学-日本抗加齢医学会雑誌、2011年、6ページ

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

○研究室ホームページ

<http://www.cp.kyoto-u.ac.jp/Kawamura/KawamuraIndex.html>

○マスコミ報道など

1) 朝日新聞「ヒト応用へがん化防げ」平成21年11月5日

2) 日本経済新聞「脂肪から効率よくiPS」平成22年2月5日

○教育・研究指導活動の状況

1) 京都大学生命科学研究科 Lecture at Grad Sch of Biostudies, 平成22年6月2日

2) 京都大学生命科学研究科 生命科学特論K、平成22年11月2日

○受賞歴

1) 第4回循環器再生医科学賞(基礎研究部門)、第74回日本循環器学会、平成22年3月6日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川村 晃久 (Kawamura Teruhisa)

京都大学・生命科学系キャリアパス形成ユニット・助教

研究者番号：90393199

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし