

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23659419  
 研究課題名（和文） 異種間ヘテロカリオン細胞の包括的遺伝子解析によるヒト心筋細胞初期変換因子群の確立  
 研究課題名（英文） Identification of cardiac reprogramming factors by heterokaryon-based genes expression analysis  
 研究代表者  
 王 英正 (OH HIDEMASA)  
 岡山大学・岡山大学病院・教授  
 研究者番号：50372579

## 研究成果の概要（和文）：

ヒト細胞における心筋細胞への直接誘導因子群は明らかでなく、本研究において、ヒト心筋前駆細胞とマウス成熟心筋細胞との異種間細胞融合法を用いてヘテロカリオン細胞を製作し、本質的な心筋細胞への再プログラム化因子群を同定した。本研究により、従来のGATA4, Mef2c, Tbx5に加え、Myocardin, Hand2といった複合的な制御転写因子群が必須であり、合計5因子群による心筋前駆細胞から直接心筋細胞への形質変換法の確立に成功した。

## 研究成果の概要（英文）：

We employed a heterokaryon-based gene screening approach to identify the crucial transcription factors might be involved in direct cardiac reprogramming. By using this novel technique, we found a series of transcription factors essential for right and left ventricular formation include GATA4, Mef2c, Tbx5, Myocardin, and Hand2 were capable of converting the cardiac progenitor cells toward mature cardiomyocytes directly in vitro.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心臓内幹細胞、直接再プログラム化、心筋細胞、転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト胚性幹(ES)細胞とヒト皮膚線維芽細胞をポリエチレングリコール(PEG)処理下で共培養すると、細胞間融合を介して、ヒト皮膚線維芽細胞はES細胞に形質変換される(*Science*;309:1369,2005)。融合した細胞には、同数体の染色体をもった核融合細胞と両者の染色体が混合した形態を示すヘテロカリ

オン細胞の2種類に分けられる。ヘテロカリオン細胞の特徴は細胞分裂を伴わず、同数体のモザイク染色体をもち、分裂能力のあるハイブリッド細胞とは異なる。この現象は、細胞間融合後も、元細胞の染色体情報をそれぞれ読みだすことが可能となり、細胞の形質変換を司る重要な規定因子群の同定に極めて有用である(*Nature*;465:704,2010)。

ヒト心臓内幹細胞とマウス心筋細胞を共培養すると、未分化な心臓内幹細胞はヒト心筋細胞の性質を獲得することが明らかとなった (*JAm Coll Cardiol*;52:1858,2008)。この事象には、細胞間融合を介したマウス心筋細胞の染色体情報が未分化のヒト心臓内幹細胞へ転座していることが示唆され、細胞融合によってできたヘテロカリオンの形態を示す融合細胞におけるヒト遺伝子情報を読み出すことで、ヒト心筋細胞分化誘導に係る重要な規定因子群を特定できる。

## 2. 研究の目的

特定諸因子群による線維芽細胞の人工多能性幹(iPS)細胞(*Cell*;126:663,2006)及び人工マウス心筋細胞(*Cell*;142:375,2010)への直接再プログラム化が報告された。しかし、ヒト心臓内細胞を人工的に心筋細胞に分化誘導する遺伝子群は不明である。細胞と細胞が融合すると新たに形成された細胞は、2種類の染色体情報をもったヘテロカリオン細胞となる。

また、ヒト心筋細胞誘導法はいまだ不明であり、特定因子群による心筋細胞へ特化した分化制御法の開発により、あらゆる不全心筋疾患へ臨床応用できる。

本研究目的は、

(1) ヒト心臓内幹細胞とマウス心筋細胞の細胞融合を介した異種間ヘテロカリオン細胞の樹立。

(2) ヘテロカリオンを示す融合心筋細胞のヒト遺伝子情報の読み出しと心筋誘導因子群の同定。

(3) 自己修復能が高い単心室症由来 iPS 細胞におけるヒト心筋細胞特異的転写因子群の同定。

(4) (2) と (3) における候補因子群または *GATA4/Tbx5/Mef2C* による人工ヒト心筋細胞の樹立。

## 3. 研究の方法

(1) ヘテロカリオン細胞の純化法は、ヒト心臓内幹細胞を *PGK-mcherry* としてマウス心筋細胞を *PGK-eGFP* でそれぞれ標識、共培養後 PEG 処理し二重陽性細胞をソーティングする。

(2) *Human Genome Oligo Microarray* 用いて、二重陽性細胞でのヒト遺伝子を網羅的に検索する。

(3) 候補遺伝子群のヘテロカリオン細胞内でのノックダウンによる遺伝子絞り込み。

(4) 樹立した単心室及び二心室心由来の iPS 細胞株及び心臓内幹細胞株を用いて網羅的遺伝子解析し、既報の *zebrafish* の心臓自己再生因子群との比較検討することで、単心室症特異的な発現様式を示す心筋分化初期に重要な転写因子群を同定する。

(5) ③と④における候補因子群もしくは *GATA4/Tbx5/Mef2C* をヒト心臓内幹細胞に直接導入することによって、ヒト心筋細胞へ分化誘導するプログラムを決定する。

## 4. 研究成果

ヒトとマウスの細胞間融合を介して形成されたヘテロカリオン細胞は、マウスの細胞性質を獲得したヒト遺伝子情報が独立して発現誘導しており、細胞形質変換の初期スイッチを握る重要な因子群の発現量が大きく変化していた。

効率よくヒト細胞をマウスの形質に変換させるためには、ヒト：マウスの混合細胞比を 1：3 より開始し、ヒト心筋細胞の形成率を全細胞の 1%以上となるまで調節した。

作成したヘテロカリオン細胞を用いて、マイクロアレイで選別したマウス由来の遺伝子群のうち、心筋細胞の再プログラム化因子群にかかると想定される候補因子群を 16

個に絞り込み、それぞれの候補遺伝子群をヒト心臓内幹細胞内に導入することで、心筋細胞の成熟化を定量化した。

一連のスクリーニング実験により、最終的に GATA4, Mef2c, Tbx5, Myocardin, Hand2 が最もヒト成熟心筋細胞への直接分化誘導に必須不可欠な転写因子群であることを明らかにした。

本研究成果は未分化の心筋前駆細胞から最も効率に成熟心筋細胞への系統誘導因子群を明らかにした研究であり、今後、実質的な心筋細胞を用いた再生医療研究への展開が期待される。

#### 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 1 件)

1. Rodriguez G, Ueyama T, Ogata T, Czernuszewicz G, Tan Y, Dorn GW 2nd, Bogaev R, Amano K, Oh H, Matsubara H, Willerson JT, Marian AJ. Molecular Genetic and Functional Characterization Implicate Muscle-Restricted Coiled-Coil Gene (MURC) as a Causal Gene for Familial Dilated Cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* 4(4): 394-358(2011)  
査読あり

[学会発表] (計 15 件)

1. 王 英正 希少難治性心不全に対するヒト幹細胞移植療法の長期的エビデンス 第12回日本再生医療学会 (2013.3.21)
2. Oh H. iPS細胞を用いた心疾患の新たな診断法と治療開発 岡山大学サイエンスカフェ (2013.2.8)
3. 王 英正 疾患特異的幹細胞およびiPS細胞を駆使した希少小児心疾患に対す

る細胞治療と病態解明 消化器研究セミナー 岡山大学 (2013.1.10)

4. Oh H, Tarui S, Ohtsuki S, Sano S. Cardiac progenitor cell infusion in patients with hypoplastic left heart syndrome: a prospective phase 1 clinical trial. Japanese Heart Failure Society 仙台 (2012.12.2)
5. Oh H. Mending and Modeling the Congenital Heart Diseases by Patient-Specific Cardiac Progenitors. Symposium at Texas Heart Institute ヒューストン 米国 (2012.11.4)
6. 王 英正 心筋再生医療の臨床試験と研究開発状況 技術情報協会セミナー 東京 (2012.11.20)
7. 王 英正 重度心臓病に対する心筋再生医療 オープンフォーラム 2012 岡山 (2012.10.27)
8. 王 英正 Mending and Modeling the Congenital Heart Diseases by Patient-Specific Cardiac Progenitors 東京女子医科大学 第3回最先端研究開発支援プログラム(FIRST)セミナー 東京 (2012.10.05)
9. 王 英正 第15回遺伝子治療推進産学懇話会 小児心不全への再生医療の可能性 京都大学東京オフィス (2012.9.25)
10. 王 英正 左心低形成症候群に対する心臓内幹細胞自家移植療法 第7回岡山心移植心不全研究会 岡山 (2012.9.4)
11. 王 英正 岡山心臓血管外科カンファレンス 小児心不全への細胞治療の可能性 岡山 (2012.7.21)
12. 王 英正 橋渡し研究加速推進ネットワークシンポジウム 小児心不全に対

する細胞治療の中間報告と疾患特異的i  
PS細胞の樹立による次世代心臓再生法  
の開発 岡山 (2012.7.7)

13. 王 英正 小児心不全と細胞治療 先  
天性心疾患シンポジウム 岡山  
(2012.5.27)
14. 王 英正 心不全の心筋再生医療 岡  
二会 岡山 (2012.1.28)
15. 王 英正 小児心不全への細胞治療の  
現状と展望 重症心不全治療フォーラ  
ム 岡山 2011.10.22

[図書] (計 4 件)

1. 小林純子、佐野俊二、王 英正 先天性  
心疾患に対する心筋再生医療 循環器  
内科 71(4):360-368 科学評論社  
(2012)
2. 王 英正 テロメア生物学から心筋再  
生医療の実用化へ 岡山医学会雑誌  
124;27-34(2012)
3. 王 英正 小児心不全への細胞治療の  
現状と展望 呼吸と循環 医学書院  
60;S1-S4 (2012)
4. 樽井 俊、佐野俊二、王 英正 小児心  
不全への細胞治療 Medical Science  
Digest 特集;37:439-442 (2011)

[その他]

ホームページ等

<http://shin-iryu.jp/section/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

王 英正 (OH HIDEMASA)  
岡山大学・岡山大学病院・教授  
研究者番号：50372579

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし