

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659426

研究課題名(和文)リプログラミングによるヒト心臓線維芽細胞から心筋細胞への直接誘導

研究課題名(英文)Direct reprogramming of human fibroblasts into cardiomyocyte-like cells

研究代表者

家田 真樹 (Ieda, Masaki)

慶應義塾大学・医学部・特任講師

研究者番号：70296557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト心臓線維芽細胞および皮膚線維芽細胞を培養して心筋リプログラミングを行った。マウスで有効であった3つの遺伝子Gata4, Mef2c, Tbx5のみではヒト細胞の心筋誘導に不十分であることが分かった。そこで新たに心筋細胞特異的に発現している11の遺伝子の中からヒト心筋リプログラミングに必須の因子をスクリーニングした。その結果、GMTにさらに2因子を加え5因子にすることでヒト心筋リプログラミング効率が改善することを見出した。5因子により誘導されたヒト心筋様細胞は心筋特異的な遺伝子発現を示し、また心筋に特徴的な生理機能も確認できた(Wada et al, PNAS, 2013)。

研究成果の概要(英文)：Direct reprogramming of differentiated human somatic cells into cardiac cells holds great promise for regenerative medicine. It has not been whether human fibroblasts can be directly reprogrammed into differentiated cardiomyocytes by defined factors. Here, we demonstrate that Gata4, Mef2c, and Tbx5 could also convert postnatal human cardiac fibroblasts directly into cardiomyocyte-like cells, when combined with two additional cardiac transcriptional regulators. Human induced cardiac cells expressed multiple cardiac-specific markers, changed a global gene expression profile toward a cardiomyocyte-like state, and generated spontaneous Ca transients. Importantly, a subset of induced cardiac cells matured to exhibit action potentials and contracted synchronously when co-cultured with primary murine cardiomyocytes. Thus, human fibroblasts can be converted into cardiomyocyte-like cells and these methods may facilitate future applications in regenerative purposes.

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 再生

1. 研究開始当初の背景

心臓はさまざまな種類の細胞より構成されている臓器で、心筋のみならず、血管、線維芽細胞などによりその機能は綿密に制御されている。心臓を構成する細胞のうち細胞数で見ると心筋細胞は全体の約 30%程度で、残り 50%以上は線維芽細胞で占められている。心筋細胞は終末分化細胞で再生できず、心臓は障害を受けると線維芽細胞の増殖により癒痕化し心機能は低下する (Ieda M, Dev Cell, 2009)。

そこで心筋再生医療は心臓病に対する未来の治療として期待されており、iPS 細胞をはじめとした幹細胞はその有力な細胞源として世界中で活発に研究が行われている。しかし幹細胞の使用には分化誘導効率、腫瘍形成の可能性、細胞の生着の問題など様々な問題が指摘されている。もし心臓内に多数存在する心臓線維芽細胞を直接その場で心筋細胞に高率に転換できたらこれらの問題を解決できる。1987 年に骨格筋のマスター遺伝子 MyoD が発見されてから、体細胞を心筋に転換できる心筋のマスター遺伝子探しが世界中で行われてきたがこれまで 20 年以上も成功していなかった。近年の複数の転写因子の導入による iPS 細胞の樹立は体細胞の可塑性を示しており、また単数ではなく複数の因子を同時に導入することで線維芽細胞を直接心筋細胞にリプログラミングできるのではないかという仮説を立てた。そこで私はまずマウスの心臓線維芽細胞から心筋細胞への直接リプログラミングを行った。

心筋リプログラミング因子の探索にはマウス胎児心筋細胞で特異的に発現する遺伝子をマイクロアレイで確認して、その中から 14 の候補因子を選択しスクリーニングを開始した。その結果、14 因子の同時導入により 1.7%の線維芽細胞が心筋様細胞 (誘導心筋細胞、Induced Cardiomyocytes) に転換することがわかった。さらにその 14 因子の中で心筋リプログラミング因子を絞った結果、心臓発生に重要な 3 つの転写因子 (Gata4, Mef2c, Tbx5) の同時導入で 17%の細胞が iPS 細胞を介さずに直接誘導心筋細胞に転換することを確認した。誘導された心筋細胞では心筋特異的マーカーの発現、心筋細胞に類似したグローバルな遺伝子発現パターン、エピジェネティックな変化、自律的な細胞の拍動が認められた。3 因子を導入した線維芽細胞をマウス心臓内に移植したところ心筋細胞への分化転換も観察された。以上よりマウスにおいて体細胞を心筋細胞へ直接リプログラミングすることに成功し本年報告した (Ieda M, Cell, 2010)。

2. 研究の目的

心筋は終末分化細胞で再生能力がないため、心臓障害後は心臓内の線維芽細胞が増殖・癒痕化し心機能は低下する。我々はマウス心臓線維芽細胞に心筋細胞特異的な 3 つの転写因

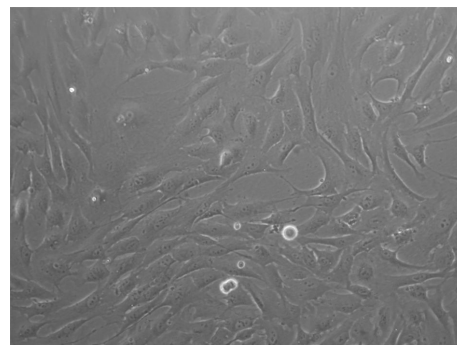
子を導入することで、iPS 細胞のような幹細胞を経ることなく直接心筋様細胞 (誘導心筋細胞: induced cardiomyocyte) を作成することに成功した (Ieda M., Cell, 2010)。この方法は (1) 線維芽細胞から直接心筋細胞のみを作成できる (2) 線維芽細胞から心筋細胞作成までの時間が短縮する (3) 細胞移植の必要がなくなるなど大きな利点があり、これまでの幹細胞を用いた再生医療の課題を一気に解決できることが期待される。本研究ではヒトの心臓線維芽細胞から直接心筋細胞を作成することを目標とする。結果、心臓再生医療実現を大きく加速させることが予想される。

3. 研究の方法

(1) ヒト心臓線維芽細胞から直接リプログラミングによる心筋細胞誘導の系を確立する。

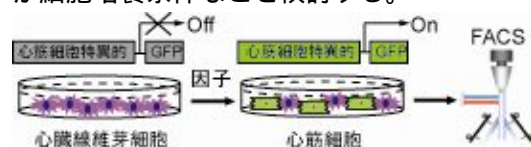
ヒト心臓線維芽細胞の培養法、最適な遺伝子導入法、心筋分化転換の確認法など心筋細胞誘導の系を確立する

基本的に我々がすでに確立したマウスでの実験系を参考に行う。心筋リプログラミング因子のスクリーニングを行うためヒト心臓線維芽細胞の培養系を確立する。方法としては心臓外科手術でカニューレシヨンのため取り除く心筋組織から心臓線維芽細胞を培養する。通常は破棄される組織を用いるため、患者に新たな負担を加えることはなく人権擁護上特に問題とならない。これまでの予備実験でヒト心臓線維芽細胞の培養に成功している (図 1)。



(図 1) ヒト心臓線維芽細胞の培養

マウスで成功した心筋リプログラミング因子群をレンチウイルスおよびレトロウイルスを用いて導入し誘導心筋細胞を作成する。心筋分化転換の確認を行うため成熟分化した心筋細胞のみで特異的に発現する蛋白の発現を確認する。スクリーニング方法としてはもっとも定量性のある FACS を使用できるか細胞培養条件などを検討する。



(図 2) 心筋細胞誘導のスクリーニング

これにより心臓線維芽細胞から心筋細胞への転換を網羅的に解析することが可能になる(図2)。

14 遺伝子から心筋リプログラミングに必須の因子を同定する

もしマウスで成功した心筋リプログラミング因子群でヒト誘導心筋細胞作成に成功しない場合は、心筋細胞特異的に発現している14 遺伝子からヒト心筋リプログラミングに必須の因子を絞り込む(Ieda M et al., Dev Cell 2009, Cell 2010)。その際は上記のスクリーニング方法を使用できる。

(2) ヒト誘導心筋細胞と心筋細胞の相違を明らかにする。

ヒト誘導心筋細胞の詳細な遺伝子プロファイル、生理的機能を検討する
心臓線維芽細胞から分化転換した誘導心筋細胞の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ、定量的 RT-PCR、免疫染色などで心筋細胞と比較検討する。また誘導された心筋細胞の Ca イメージング、パッチクランプ、細胞拍動の観察などを行い、心筋細胞に特徴的な生理機能を持つか検討する。

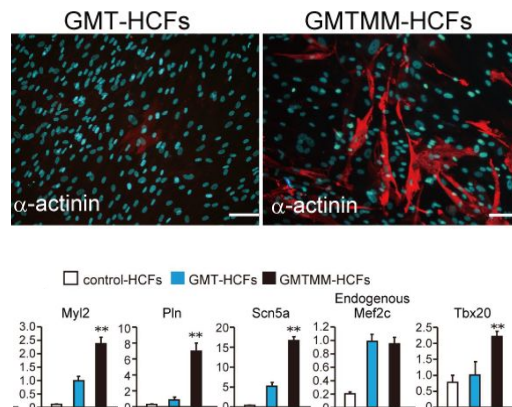
ヒト線維芽細胞から誘導心筋細胞への直接リプログラミングの過程を解析する
誘導心筋細胞の遺伝子発現の時間的な変化をマイクロアレイを用いてグローバルに解析する。またエピジェネティックな変化として心筋細胞特異的な遺伝子のプロモーター領域におけるヒストン修飾、DNA メチル化を Chromatin immunoprecipitation (ChIP), Bisulfite sequencing を用いて心筋細胞、心臓線維芽細胞と比較する。

誘導された心筋細胞がたしかにリプログラミングしていることを証明するため、外から加えるリプログラミング因子(マウスの場合の Gata4, Mef2c, Tbx5)がない状態でも心筋細胞の表現型を保てるか、それにはどれくらいの期間の外因性心筋リプログラミング因子の発現が必要か等を検討する。方法としてはドキシサイクリン(Dox)による遺伝子発現誘導システムを用いて、Dox を加えている期間のみ外因性因子の発現が ON になり、Dox を除くと OFF になる系を構築する。すでにマウスでドキシサイクリン誘導型のレンチウイルスの系を確立しており、リプログラミングには2 週間の外因性心筋リプログラミング因子が必要であることを確認している。同様にヒト細胞でも遺伝子発現期間を1,2,4 週間と変化させ、外因性心筋リプログラミング因子の発現が必要な期間を同定し、またそのとき得られる誘導心筋細胞の遺伝子発現、生理機能などを解析する

4. 研究成果

(1)ヒト心筋リプログラミング因子を同定
我々はこれまでにヒト心臓線維芽細胞の培

養に成功し、ヒト心筋リプログラミング因子のスクリーニングシステムを確立した。まず Gata4, Mef2c, Tbx5 の3つの遺伝子で心筋リプログラミングを試みたがヒト線維芽細胞からの心筋誘導には不十分であることを見出した。そこで新たに心筋細胞特異的に発現している 11 遺伝子を用いてヒト心筋リプログラミング因子のスクリーニングを行った。その結果 GMT にさらに2 因子(Myocd, Mesp1)を加えて5 因子(GMTMM)にすることでヒト心筋リプログラミング効率が著明に改善することを見出した(図3)。

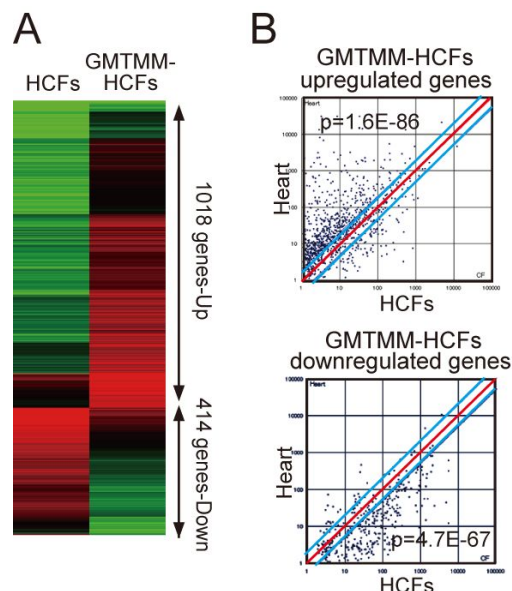


(図3) GMT に2 因子を加えてヒト心筋リプログラミング改善

GMT と比較し2 因子を加えた GMTMM で心筋遺伝子の発現が上昇。免疫染色(上)と定量的 RT-PCR で確認(下)

(2) ヒト誘導心筋細胞の分子生物学的解析の結果

GMT にさらに2 因子を加えた5 因子による心筋誘導のマイクロアレイ解析を行った。その結果、心筋遺伝子群の上昇と線維芽細胞遺伝子群の低下などグローバルな心筋細胞様の遺伝子発現パターンの変化を確認した(図4)。



C

Top 5 GO categories enriched in GMTMM-HCFs upregulated genes

GO ID	GO term	Genes	Size	p-value
GO:0007165	Signal transduction	93	1173	2.0E-19
GO:0006955	Immune response	40	384	1.4E-12
GO:0030049	Muscle filament sliding	11	37	3.5E-9
GO:0007267	Cell-cell signaling	24	241	9.8E-8
GO:0007517	Muscle organ development	14	94	3.7E-7

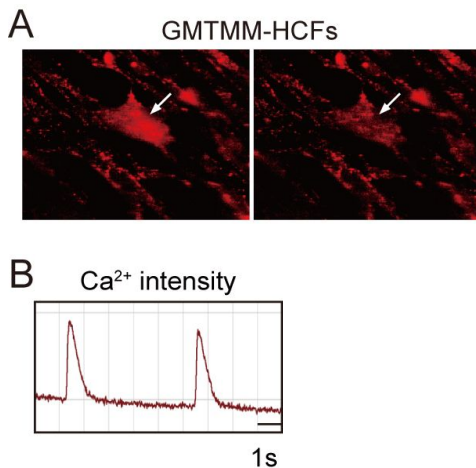
Top 5 GO categories enriched in GMTMM-HCFs downregulated genes

GO ID	GO term	Genes	Size	p-value
GO:0051301	Cell division	32	276	5.4E-24
GO:0000278	Mitotic cell cycle	21	91	1.3E-22
GO:0008283	Cell proliferation	7	12	9.2E-12
GO:0007018	Microtubule-based movement	8	23	5.3E-11
GO:0007155	Cell adhesion	25	553	9.9E-10

(図4) マイクロアレイデータ

- A) 5 因子導入により発現が変化した遺伝子群
 B) 発現が上昇した遺伝子は心筋特異的で、発現が低下した遺伝子は線維芽細胞特異的の遺伝子である
 C) GO term 解析により変化した遺伝子機能を解析

(3) ヒト誘導心筋細胞の機能的解析の結果免疫染色法によりヒト誘導心筋細胞でさまざまな心筋特異的遺伝子の発現、Ca イメージングで自発的な細胞内 Ca 濃度の変化など心筋に特徴的な生理機能も確認できた (図 5)。またラット心筋との共培養で分化が促進して周囲の細胞と協調した細胞拍動や活動電位を認めた。



(図5)ヒト誘導心筋細胞の生理機能 Rhod-3 による細胞内 Ca 濃度変化の観察(A)と、そのトレース(B)。

(4) 得られた成果のインパクト、展望
 以上よりこれまでにヒト心筋細胞を高効率で誘導する新規心筋リプログラミング因子を見出した。この結果を原著論文として (Wada et al, PNAS, 2013) に発表した。本論文は各マスメディアでも大きく報道されて社会的にも大きな反響があった。今後の課題としてはヒト誘導心筋細胞の詳細な解析や心筋リプログラミング効率のさらなる改

善、リプログラミングの分子機構解明などが重要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計12件)

(1)Wada R, Muraoka N, Inagawa K, Yamakawa H, Miyamoto K, Sadahiro T, Umei T, Kaneda R, Suzuki T, Kamiya K, Tohyama S, Yuasa S, Kokaji K, Aeba R, Yozu R, Yamagishi H, Kitamura T, Fukuda K, Ieda M. Induction of Human Cardiomyocyte-like Cells from Fibroblasts by Defined Factors. Proc Natl Acad Sci U S A. 110 (31):12667-72. (2013). doi: 10.1073/pnas.1304053110. 査読有

(2)Qian L, Berry EC, Fu JD, Ieda M, Srivastava D. Reprogramming of mouse fibroblasts into cardiomyocyte-like cells in vitro. Nat Protoc. 8(6):1204-15, (2013). doi: 10.1038/nprot.2013.067. 査読有

(3)Inagawa K, Miyamoto K, Yamakawa H, Muraoka N, Sadahiro T, Umei T, Wada R, Katsumata Y, Kaneda R, Nakade K, Kurihara C, Obata Y, Miyake K, Fukuda K, Ieda M. Induction of Cardiomyocyte-like Cells in Infarct Hearts by Gene Transfer of Gata4, Mef2c, and Tbx5. Circulation research. 111:1147-56, (2012).

doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.271148. 査読有

(4) Srivastava, D., and Ieda, M. Critical factors for cardiac reprogramming. Circulation research. 111:5-8, (2012). doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.271452. 査読有

〔学会発表〕(計86件)

(1) Masaki Ieda, "Direct Reprogramming of Fibroblasts into Cardiomyocyte-like Cells in Infarct Hearts" Stem Cell and Regenerative Medicine Global Congress 2013, 2013.3.27-3.29, Seoul, South Korea.

(2) Masaki Ieda, 第77回日本循環器学会学術集会 プレナリーセッション, "Direct Conversion of Fibroblasts into Cardiomyocyte-like Cells by Defined Factors", 2013.3.15-3.17, 横浜

(3) 家田真樹, 第48回日本小児循環器学会会長特別企画 世紀の発見が医療を変える, "直接リプログラミングによる心筋細胞の作製" 2012.7.5, 京都

(4) Masaki Ieda, American Heart Association Scientific Sessions 2011, Pluripotent Stem Cell Biology, "Direct Reprogramming of Fibroblasts into Functional Cardiomyocytes", 2011.11.12-11.16, Orlando, Florida, USA.

〔図書〕(計27件)

(1) Masaki Ieda, CRC Press, Taylor and

Francis Group, Induced Cardiomyocytes: Direct reprogramming for cardiac regeneration “ Cardiac Regeneration Using Stem Cells ” USA. p258-275, 2013.

(2) Masaki Ieda, Humana Press, Springer, Cellular Reprogramming and Fate Conversion “ Advances in Stem Cell Research ” USA. p211-225, 2012.

(3) 貞廣威太郎、家田真樹, 実験医学, ダイレクトリプログラミングによる心筋誘導 2013年8月号, Vol.31, No.13, p2062-2067, 2013.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

報道

朝日新聞、東京新聞、毎日新聞、日本経済新聞、日経産業新聞、産経新聞、読売新聞、日刊工業新聞、中日新聞、TBS ニュース、時事通信、共同通信、日経バイオテク、北海道新聞、河北新報、信濃毎日新聞、静岡新聞、沖縄タイムズ、化学工業日報、西日本新聞、東奥日報、北国新聞、富山新聞、北日本新聞、大阪日日新聞、山陽新聞、日本海新聞、大分合同新聞、宮崎日日新聞、などに関連記事掲載 『ヒトで心筋直接作製』 2013年7月16日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

家田 真樹 (IEDA, Masaki)

慶應義塾大学・医学部・特任講師

研究者番号 : 70296557