

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670394

研究課題名(和文) センダイウイルスベクターを用いた安全かつ効率の良い心筋直接誘導法の開発

研究課題名(英文) Efficient and safe reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes with Sendai viral vectors

研究代表者

家田 真樹 (Ieda, Masaki)

慶應義塾大学・医学部・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

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに心筋リプログラミング遺伝子をレトロウイルスベクターで遺伝子導入することで直接心筋作製可能であることを示してきた。しかしながら臨床応用には挿入変異のない安全なベクターの開発が必要と考えて、センダイウイルスベクターによる安全な心筋誘導確立を目指して本研究を行った。これまで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作製して、このベクターを用いることでマウス線維芽細胞を直接心筋細胞にリプログラミングすることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Heart disease remains a leading cause of death worldwide, and new therapies are highly demanded. As cardiomyocytes are terminally differentiated cells, regenerative therapy has emerged as an attractive approach for the treatment of heart failure. Direct cardiac reprogramming approach might be a powerful strategy toward this treatment. We reported that a combination of three cardiac-specific transcription factors, Gata4, Mef2c, and Tbx5 (GMT), could directly reprogram fibroblasts into cardiomyocyte-like cells in vitro and in vivo. The aim of this study is to develop new Sendai viral vectors (SeVs) which overexpress reprogramming factors without genomic integration, and to determine the efficiency and safety of cardiac reprogramming with SeVs. We generated SeVs vectors containing GMT and found that the vector could efficiently reprogram mouse fibroblasts into cardiomyocyte-like cells in vitro.

研究分野：医歯薬学

キーワード：心臓 再生

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞などの疾患に起因する心機能障害に対して、これまで様々な治療法が開発されてきたが、依然として心不全は本邦における重大な死因の一つである。心臓はもっとも再生困難な臓器であり、心筋細胞は終末分化細胞で再生できず、心臓障害後は線維芽細胞の増殖により癒痕化し心機能が低下する (Ieda et al, 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、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞: induced pluripotent stem cells) 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。

2006 年、マウスの体細胞に山中 4 因子 (Oct4, sox2, klf4, c-myc) をレトロウイルスベクターで導入し ES 細胞と同等な iPS 細胞を作製できること、2007 年にはヒト細胞からも iPS 細胞を作製できることが報告された (Takahashi et al, Cell 2006 Cell 2007)。その後、安全な遺伝子導入法が開発され、アデノウイルス、プラスミド、RNA、センダイウイルスなど non-integration ベクターでも iPS 細胞を誘導できることが報告されたが、その中でもセンダイウイルスは最も高い iPS 誘導効率を示した。この数年間で iPS 細胞研究は顕著な進展を認めているが、幹細胞使用に伴う腫瘍形成の可能性、心筋分化誘導効率、細胞生着の問題は依然克服すべき課題として残っている。

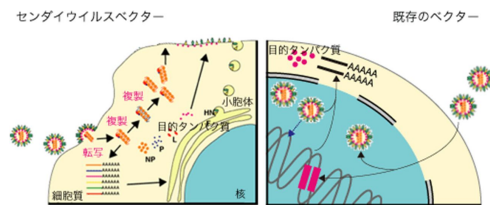
我々は、心臓内に存在する心臓線維芽細胞を生体内において直接心筋細胞へ分化誘導できればこれらの問題を解決することが可能と考え研究を開始した。これまでに心臓線維芽細胞の遺伝子発現プロファイルなどを世界に先駆けて明らかにし、その成果を応用して Gata4/Mef2c/Tbx5 (GMT) の 3 つの心筋特異的転写因子が線維芽細胞を心筋細胞に直接リプログラミングできる因子であることを発見した (Ieda et al, Cell 2010)。また GMT を心筋梗塞モデルマウスの心臓に直接遺伝子導入して、線維芽細胞を心筋細胞に生体内でリプログラミングして心臓再生することに成功した (Inagawa et al, Circ Res, 2012)。以上のように、**心筋特異的な 3 つの転写因子 (Gata4, Mef2c, Tbx5) を用いた心筋リプログラミング法を in vitro, in vivo で成功したが (Ieda et al, Cell 2010, Inagawa et al, Circ Res, 2012)**。これまでの方法ではレトロウイルスベクターを使用しているため導入遺伝子が宿主染色体に integration されるという安全面での問題が存在した。

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。我々はこれまでに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。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。

本研究ではこの新しい治療法の安全性を改善するため新たなウイルスベクターとして iPS 細胞誘導にも用いられている non-integration RNA ベクターであるセンダイウイルスに着目した。センダイウイルスは分裂・非分裂細胞を問わず、哺乳類の多くの細胞種に遺伝子を導入することが可能で、高い外来遺伝子の発現能を有する。またゲノムは RNA からできておりセンダイウイルスが宿主核内の染色体を改変するリスクはなく、機能性、安全性の両面で有利な特徴を有している。**そこで本研究ではセンダイウイルスベクターを用いた安全かつ効率の良い心筋直接リプログラミング法を確立することを目的とする (図 1)**。本研究により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。



(図 1) センダイウイルスと既存のベクターによる遺伝子導入法の比較 (ディナベック社より引用) 左はセンダイウイルスを用いた遺伝子導入法、右は既存のベクター (レトロウイルスなど) による導入法

3. 研究の方法

(1) 心筋リプログラミング因子発現センダイウイルスベクター作製とウイルスベクター導入量の決定

マウス線維芽細胞への最適な遺伝子導入量を決定するため、まず GFP のセンダイウイルスベクターを用いて遺伝子導入効率を FACS、位相差蛍光顕微鏡で検討する。次に、心筋リプログラミング因子のセンダイウイルスベクターをディナベック社と共同研究で開発する。ベクターは遺伝子発現をコントロールできる温度感受性のベクターを使用することとした。センダイウイルスによるリプログラミング因子の細胞内での発現を確

認するため、ポジコンとしてレトロウイルスによる遺伝子導入法と比較する。センダイウイルスは MOI を振り、レトロウイルスによる遺伝子導入法とで各因子の発現を QRT-PCR で測定する。

(2) 直接リプログラミングによりマウス線維芽細胞から心筋を誘導

心筋リプログラミング因子のセンダイウイルスベクターを用いてαMHC-GFP TG マウスの胎児線維芽細胞 (MEF) から心筋を直接誘導する。このマウスは心筋細胞特異的なプロモーターの下流に GFP 遺伝子が配置されているため、成熟分化した心筋細胞のみ GFP を発現する。この細胞を用いて線維芽細胞から心筋細胞への転換を FACS で定量的に解析することが可能になる。またレトロウイルスで心筋誘導した細胞をポジコンとして使用する。さらに心筋特異的蛋白の発現として cardiac troponin T (cTnT) を FACS で定量的に解析し、さまざまな心筋蛋白の発現を確認する。

(3) 誘導心筋細胞の詳細な遺伝子発現プロファイル、生理的機能の解析

線維芽細胞からセンダイウイルスベクターにより誘導される心筋細胞の蛋白発現を免疫染色で確認する。また誘導心筋細胞を aMHC-GFP をマーカーとして FACS で選別し、遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ、定量的 RT-PCR などにより培養心筋細胞、線維芽細胞と比較する。また誘導心筋細胞の Ca イメージング、パッチクランプなどを行い、心筋細胞に特徴的な生理機能を持つか検討する。

さらに心筋を直接誘導後に外来遺伝子の発現を中止し、誘導心筋が維持されるか検討する。センダイウイルスにより誘導された心筋でリプログラミング因子の宿主 DNA への integration の有無をまずサザンプロット法、PCR 法を用いて確認する。原理的にセンダイウイルスは RNA ベクターのため宿主核内の染色体を改変するリスクはない。次に心筋誘導後に細胞培養温度を 38-39 度に上昇し、外来遺伝子の発現を中止後も心筋の表現型が保たれるか検討する。その際、誘導心筋におけるセンダイウイルスの有無を QRT-PCR、免疫染色で確認する。

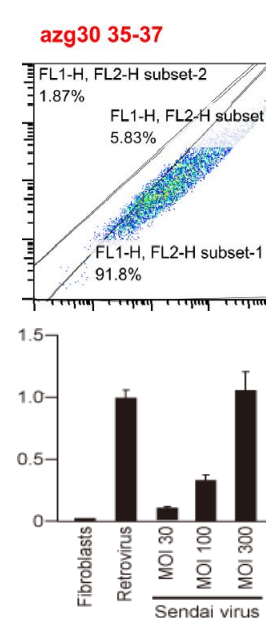
本研究で用いる TS-7 ベクターは 39 度 3 日間の培養で遺伝子発現が消失し、その後 37 度に温度回復後も遺伝子発現が消失したままであることが共同研究のディナベック社により確認されている。

4. 研究成果

(1) 心筋リプログラミング因子発現センダイウイルスベクター作製とウイルスベクター導入量の決定

これまでの実験の結果、温度は 35 度で感染させ、ウイルス量 (MOI) を 3 で 80%、30

以上にすると 90%以上のマウス細胞がウイルスに感染することを確かめた(図2)。また MOI を 300 まで上昇させても 99%の細胞が感染し、細胞障害性もないことを確認した。これまでの実験で心筋リプログラミング因子発現するセンダイウイルスベクター作製に成功した(図3)。

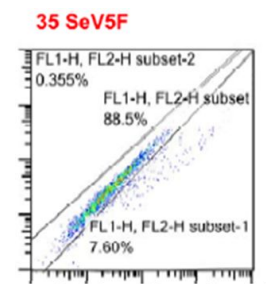


(図2)センダイウイルスの感染効率 MOI 30 で 91%の感染効率

(図3)センダイウイルスで心筋リプログラミング因子発現

(2) 直接リプログラミングによりマウス線維芽細胞から心筋を誘導

これまでの実験でセンダイウイルスの感染温度は 35 度オーバーナイト処理が 37 度より優れていること、心筋の誘導効率はレトロウイルスと比べ遜色ないことを確認している(図4)。



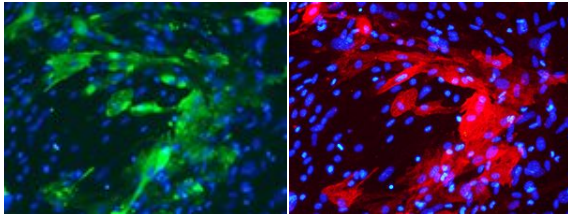
(図4)センダイウイルスで心筋リプログラミングの FACS データ αMHC-GFP 誘導効率は 7.6%

(3) 誘導心筋細胞の詳細な遺伝子発現プロファイル、生理的機能の解析

これまでの実験で約 1 か月後に aMHC-GFP および心筋マーカーである a-actinin の発現を免疫染色で確認できた(図5)。さらに一部の細胞で心筋拍動、細胞内 ca 濃度変化を観察した。今後さらに詳細な機能解析を行う。

(図5)センダイウイルスで心筋リプログラミングの免疫染色データ

aMHC-GFP (緑、左) a-actinin (赤、右) の発現を確認した



これまで外来遺伝子を non-integration で安全性の高い方法で心筋リプログラミングする方法は報告されておらず、本研究は世界では初めての報告となる。この心筋リプログラミング法は (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、再生医療実現が大いに期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 18 件)

1. Yamakawa H, Muraoka N, Miyamoto K, Sadahiro T, Isomi M, Haginiwa S, Kojima H, Umei T, Akiyama M, Kuishi Y, Kurokawa J, Furukawa T, Fukuda K, **Ieda M.** Fibroblast Growth Factors and Vascular Endothelial Growth Factor Promote Cardiac Reprogramming under Defined Conditions. *Stem Cell Reports*. 5(6):1128-42,2015.doi:10.1016/j.stemcr.2015.10.019. 査読有
2. Sadahiro T, Yamanaka S, **Ieda M.** Direct Cardiac Reprogramming: Progress and Challenges in Basic Biology and Clinical Applications. *Circ Res*. 116(8):1378-1391, 2015. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305374.査読有
3. Muraoka N, **Ieda M.** Stoichiometry of transcription factors is critical for cardiac reprogramming. *Circ Res*. 116(2):216-8, 2015. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.305696.査読有
4. Muraoka N, Yamakawa H, Miyamoto K, Sadahiro T, Umei T, Isomi M, Nakashima H, Akiyama M, Wada R, Inagawa K, Nishiyama T, Kaneda R, Fukuda T, Takeda S, Tohyama S, Hashimoto H, Kawamura Y, Goshima N, Aeba R, Yamagishi H, Fukuda K, **Ieda M.** MiR-133 promotes cardiac reprogramming by directly repressing Snail and silencing fibroblast

signatures. *EMBO J*. 17;33(14):1565-81, 2014.

doi: 10.15252/emboj.201387605. 査読有

5. 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

〔学会発表〕(計 53 件)

1. **Masaki Ieda** “Direct Cardiac Reprogramming for Heart Repair” 9th International Cell Therapy Conference, **2015.10.23-24**, Seoul, South Korea.
2. **Masaki Ieda** “Reprogramming of Cardiac fibroblasts”, American Heart Association Basic Cardiovascular Sciences 2015, Plenary session, **2015.7.13-16**, New Orleans, LA, USA.
3. **Masaki Ieda** “Reprogramming Fibroblasts into Cardiomyocytes for Heart Repair”, CURRENT TRENDS IN BIOMEDICINE 2014, Cardiovascular extracellular matrix in health and disease, **2014.10.6-8**, Sede Antonio Machado, Baeza, Spain.
4. **Masaki Ieda** “Discovery, Progress, and Challenges of Direct Cardiac Reprogramming for Heart Repair”, American Heart Association Basic Cardiovascular Sciences 2014, Plenary session, **2014.7.14-17**, Las Vegas, Nevada, USA.
5. **Masaki Ieda** “Induction of Cardiomyocyte-like Cells in Infarct Hearts”, American Heart Association Scientific Sessions 2013, The Best of Circulation Research Symposium, **2013.11.16-20**, Dallas, USA.
6. **Masaki Ieda** “Induction of Cardiomyocyte-like Cells by Defined Factors”, American Heart Association Basic Cardiovascular Sciences 2013, **2013.7.22-24**, Las Vegas, Nevada, USA.

〔図書〕(計 26 件)

1. **Masaki Ieda** Springer, USA, “Semaphorin in the heart” Semaphorins: A diversity of emerging physiological and pathological activities”, 175-187, 2015.
2. **Masaki Ieda** Springer, USA, “Cardiac Reprogramming for Heart Repair” The Proceedings of Uehara Memorial Foundation, Innovative Medicine : Basic Research and Development, 253-264, 2014.
3. **Masaki Ieda** CRC Press, Taylor and Francis Group, USA. Induced Cardiomyocytes : Direct reprogramming for cardiac regeneration “Cardiac Regeneration Using Stem Cells”, p258-275, 2013.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 4 件)

1. 名称：線維芽細胞からの心臓前駆細胞と心筋細胞の直接製造方法
発明者：**家田 真樹**、貞廣 威太郎、磯見 まり、五島直樹
権利者：学校法人慶應義塾、国立研究開発法人産業技術総合研究所
番号：特願 2016-51407
出願年月日：2016 年 3 月 15 日
国内外の別：国内
2. 名称：多能性幹細胞からの心臓前駆細胞と心筋細胞の製造方法
発明者：**家田 真樹**、貞廣 威太郎、磯見 まり、五島直樹
権利者：学校法人慶應義塾、国立研究開発法人産業技術総合研究所
番号：特願 2016-51411
出願年月日：2016 年 3 月 15 日
国内外の別：国内
3. 名称：心筋様細胞の作製方法及びそれに用いる心筋様細胞の作製用組成物
発明者：井上 誠、弘中 孝史、宮本和享、**家田真樹**
権利者：学校法人慶應義塾、ディナベック株

式会社

番号：PCT/JP2015/077664

出願年月日：2015 年 9 月 30 日

国内外の別：国外

4. 名称：心筋様細胞の作製方法及びそれに用いる培地

発明者：山川裕之、**家田真樹**

権利者：学校法人慶應義塾

番号：特願 2014-096729

出願年月日：2014 年 5 月 8 日

国内外の別：国内

〔その他〕

報道

1. 朝日新聞、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、時事通信、共同通信、日経バイオテク、などに関連記事掲載 『慶大が心筋、効率良く作製 再生医療利用目指す』 2014 年 6 月 11 日

2. 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・講師

研究者番号：70296557