

家田 真樹

慶應義塾大学 医学部 講師

直接リプログラミングによる心筋細胞誘導の確立と臨床への応用

§1. 研究実施の概要

心臓病は死亡原因の上位を占め、心臓再生医療など新しい治療法の開発が期待されている。本研究では心臓内の線維芽細胞を幹細胞を介さないで直接心筋細胞に分化転換する技術の開発、およびその臨床応用に必要な研究を行う。これまでマウス細胞で3遺伝子導入により心線維芽細胞から心筋細胞への直接分化転換を確認しており、現在ヒト細胞での心筋リプログラミングの検討を行っている。またトランスジェニック動物を用いて生体内での線維芽細胞から心筋細胞への直接分化転換の至適条件の検討、有効性検証を行なう。

§2. 研究実施体制

(1)「家田」グループ

① 研究分担グループ長:家田 真樹 (慶應義塾大学医学部、講師)

② 研究項目

- ・ヒト細胞での心筋細胞誘導を確立
- ・トランスジェニック動物を用いた *in vivo* 心筋リプログラミング

§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

1. ヒト細胞での心筋細胞誘導を確立

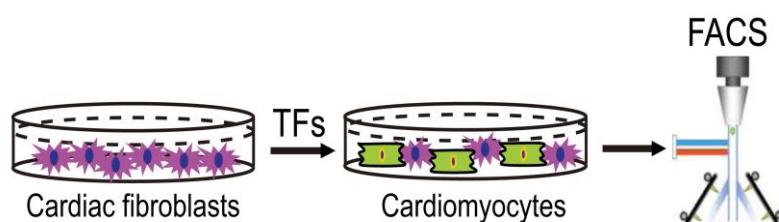
ヒト心臓線維芽細胞の培養系を確立し、今後の実験のために必要な細胞のストックを作製する。心筋誘導のスクリーニングを行い、心筋リプログラミング必須因子を決定する。

(1) 心筋リプログラミング因子のスクリーニング法を確立する

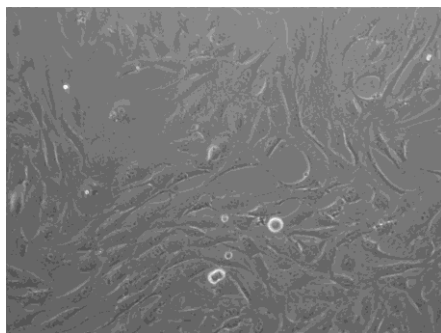
我々がすでに確立したマウスでの実験系を参考に行う。まず心筋リプログラミング因

子のスクリーニングをする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ーショ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。またヒト細胞への最適な遺伝子導入方法について検討する。その結果得られる心臓線維芽細胞から心筋細胞への転換効率を心筋マーカーの発現を指標として FACS あるいは免疫染色を用いて解析し心筋誘導因子を決定する(図 1)。これまでの実験でヒト心臓線維芽細胞の培養に成功し、現在細胞の凍結ストックを作成中である(図 2)。また 80%以上の細胞に遺伝子導入する方法も確立した(図 3)。今後、誘導されるヒト心筋細胞の詳細な遺伝子プロファイル、生理的機能などの検討も予定している。

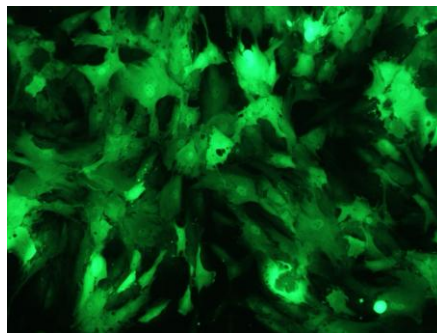
(図 1) 心筋誘導のスクリーニング方法



(図 2) ヒト心臓線維芽細胞の培養



(図 3) 80%以上の細胞に遺伝子導入成功



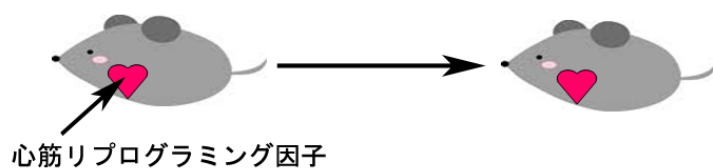
2. トランスジェニック動物を用いた in vivo 心筋リプログラミング

マウス心臓病モデルで内在性の線維芽細胞を遺伝子導入により直接心筋細胞に転換する。有効なベクター、至適条件など遺伝子導入方法を検討する。線維芽細胞標識のためのトランスジェニック動物を作製する。最終的には心筋リプログラミング因子を心臓に導入し線維芽細胞を直接心筋細胞に転換する。

(1) トランスジェニック動物の作製

誘導された心筋細胞が線維芽細胞由来か確認するため、線維芽細胞標識のためのトランスジェニック動物を作製する。これにより内在性の心臓線維芽細胞がたしかに心筋細胞にリプログラミングしたことを示すことができる(図4)。これまでにこのマウスの作成に成功し、現在は今後の実験のために必要なマウスを増やしている段階である。

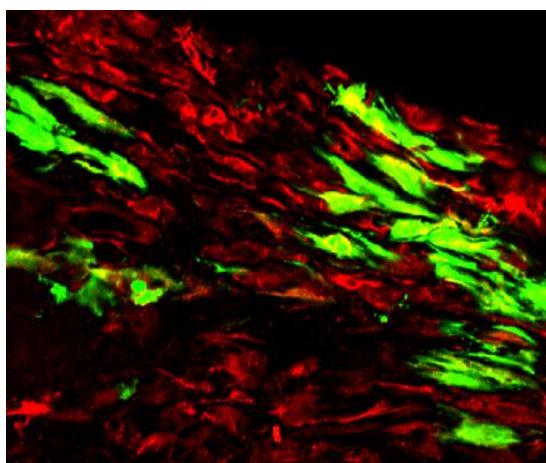
(図4) マウスの心臓にリプログラミング因子を直接導入し有効性を評価する



(2) 遺伝子導入方法の至適条件を検討する

マウス心臓病モデルを作成後、どの時期に遺伝子導入を行うと最も効率よく心筋細胞にリプログラミングできるか条件検討する。これまでに心筋梗塞マウスの心臓線維芽細胞へのGFP遺伝子導入に成功した(図5)。今後は遺伝子導入効率が最適となる条件(投与濃度、投与量、時期)をGFPウイルスで検討を行なう。この結果を踏まえ、心筋リプログラミング因子を最適条件で導入し線維芽細胞から心筋への転換を免疫染色などで確認する予定である。

(図5) 心筋梗塞マウスの心臓線維芽細胞へのGFP遺伝子導入に成功。



§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)