

「人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 作製・制御等の医療基盤技術」
平成 22 年度採択研究代表者

H24 年度 実績報告

家田 真樹

慶應義塾大学 医学部・特任講師

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. 研究実施体制

(1)「家田」グループ

① 研究代表者:家田 真樹(慶應義塾大学 医学部、特任講師)

② 研究項目

- ・ 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系の確立
- ・ マウス心筋梗塞モデルで内在性心臓線維芽細胞を直接心筋細胞に転換する-有効性、至適条件の検討

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

研究のねらい

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。これまでマウス培養細胞に3遺伝子導入により心臓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、本年度はヒト細胞での心筋プログラミングの検討を行なう。またマウス心筋梗塞モデルで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。

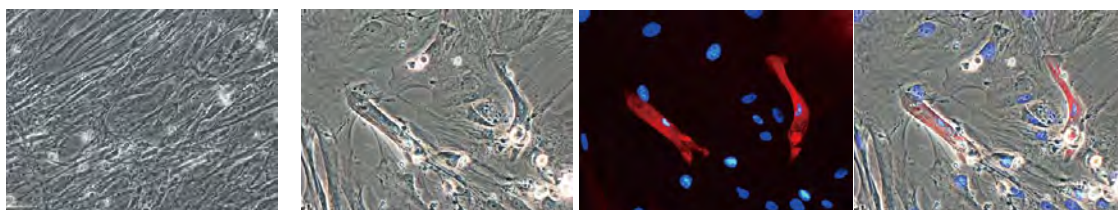
これまでの研究の概要

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

(1) 心筋プログラミング因子のスクリーニング法を確立する

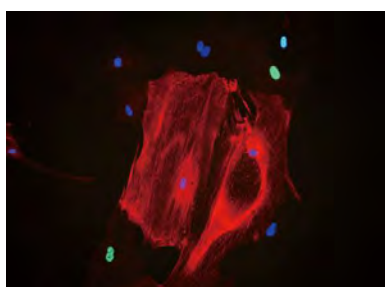
ヒト心臓線維芽細胞および皮膚線維芽細胞を培養して心筋リプログラミングを行った。過年度の実験で3因子(Gata4, Mef2c, Tbx5)により十分な心筋誘導が見られなかったため、11因子を加えて候補因子のスクリーニングを行った。その結果、3因子に新たに2因子を加えることで(計5因子)ヒト心筋誘導の改善がみられた(図1)。

(図1) ヒト線維芽細胞から心筋誘導(左陰性対照、右が5因子で誘導)心筋アクチニンを発現



(2) 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経時的に検討する

これまでの研究で5因子により線維芽細胞から直接分化した心筋様細胞に分化転換していることを経時的な遺伝子発現変化やEdUを用いた細胞増殖変化により確認した(図2)。



(図2) 誘導心筋細胞のEdU assay、細胞増殖を経ずに心筋誘導

2. マウス心筋梗塞モデルで内在性心臓線維芽細胞を直接心筋細胞に転換する - 有効性、至適条件の検討

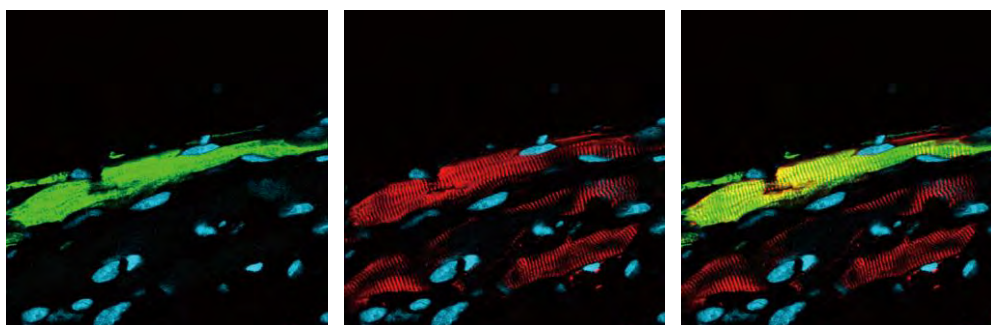
(1) マウス心筋梗塞モデルで心筋リプログラミング因子を梗塞部に導入して心臓線維芽細胞を心筋細胞に転換する

(2) 遺伝子導入方法の至適条件を検討する

生体内で内在性心臓線維芽細胞を直接心筋細胞へリプログラミング(in vivo心筋リプログラミング)することが可能か検討した。冠動脈を結紮しマウス急性心筋梗塞モデルを作製して、開胸下でレトロウイルスベクターにより遺伝子導入を行った。陰性対照では線維芽細胞から心筋細胞への誘導はみられなかったが、3つの心筋誘導遺伝子(GMT)のウイルス液をそれぞれ別々に作製してGFPと混ぜて心筋梗塞部位に注射した群では、2週後に一部の梗塞部線維芽細胞で心筋遺伝子が誘導された。しかし多くの細胞が未熟な心筋様細胞であったため、GMTが十分に細胞内に導入できていない可能性が示唆された。そこで次に

誘導心筋細胞の成熟度を改善するために3つの遺伝子を一つのベクターから同時に発現できるポリシストロニックウイルスベクター（3F2A）を開発作製した。このポリシストロニックベクターとGFPをマウス心筋梗塞部に注射したところ、複数の心筋遺伝子の誘導が定量的RT-PCRで確認された。また新生心筋細胞のうち30%で横紋構造を確認でき、3つの遺伝子を別々のウイルスベクターで導入した場合と比較して成熟心筋の誘導効率を2倍に改善することに成功した（図3）。以上の結果からGata4、Mef2c、Tbx5、3つの遺伝子を効率よく遺伝子導入することで、生体内でも心筋梗塞部位の内在性線維芽細胞を心筋様細胞に直接プログラミングできることを明らかにした⁽¹⁾。

(図3) マウス心筋梗塞後に線維芽細胞から心筋を直接誘導⁽¹⁾



研究進捗状況、研究成果、今後の見通し

現在予定通り順調に研究は進んでいる。今後ヒト誘導心筋の確立とその詳細な遺伝子プロファイル、生理的機能の検討を行う。またマウス実験では有効性評価のために心エコー、安全性などを解析する予定である。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

1. 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. *Circ Res*. 111(9):1147-56.2012
(DOI:10.1161/CIRCRESAHA.112.271148)