

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04179

研究課題名(和文)新規心臓前駆細胞リプログラミング因子の同定と分子基盤の解明

研究課題名(英文) Induction of cardiac mesoderm by defined factors

研究代表者

家田 真樹 (Ieda, Masaki)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：70296557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：心臓は再生能力に乏しく、重症心不全に対する新しい治療として再生医療が期待されている。心臓再生には幹細胞から心筋を作製し移植する方法があるが、細胞作製工程が煩雑、腫瘍形成の可能性、移植心筋の生着が困難など課題もある。これに対し、我々は心筋特異的転写因子を導入して、線維芽細胞から心筋を直接作製する心筋リプログラミング法を開発した。本研究では増殖能・多分化能を有する心臓前駆細胞の直接誘導を目指し、新規心臓前駆細胞リプログラミング因子を同定する。これまでに心臓前駆細胞リプログラミング因子としてTbx6を見出し、効率的に心臓前駆細胞や心筋細胞を含む心臓構成細胞に分化誘導することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は線維芽細胞を直接心臓前駆細胞に転換して心臓再生する全く新しい概念の研究である。これまで自らが積み上げてきた心筋直接リプログラミング研究の多くの知見や材料を利用するため、他より圧倒的に優位な立場で研究を進められる。線維芽細胞から心臓前駆細胞へのリプログラミングは、他の様々な臓器でも組織幹細胞への直接リプログラミングが可能であることを示しており、心臓再生医療実現への貢献のみならず他領域への大きな波及効果も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Adult hearts have little regenerative capacity. We found that Tbx6 overexpression could induce mesoderm and cardiac progenitor gene expression in fibroblasts. We also found that Tbx6 is critical for mesoderm induction and subsequent lineage diversification from pluripotent stem cells (PSCs). Transient Tbx6 expression induced nascent mesoderm and cardiovascular lineages from mouse and human PSCs, whereas prolonged Tbx6 expression suppressed cardiac differentiation and induced somite lineages, including skeletal muscle and chondrocytes.

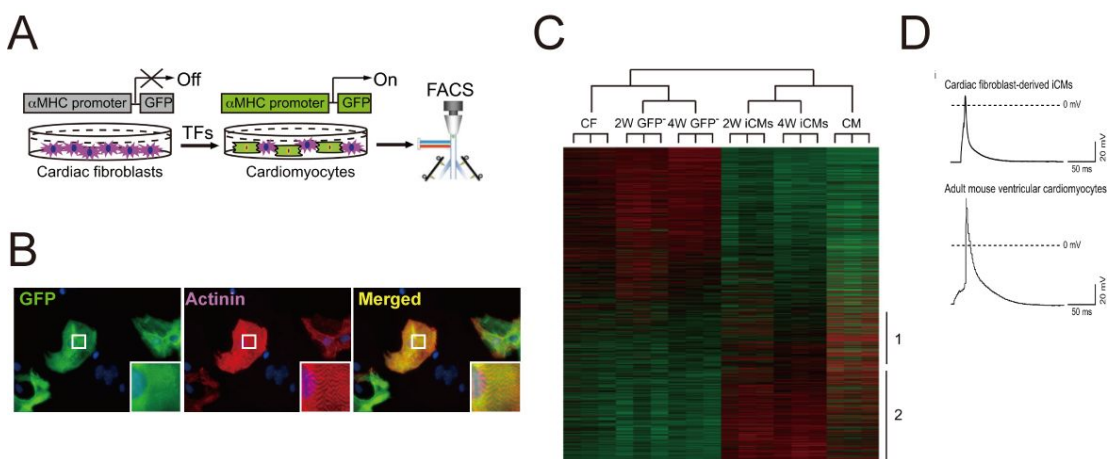
研究分野：循環器内科

キーワード：心臓再生

1. 研究開始当初の背景

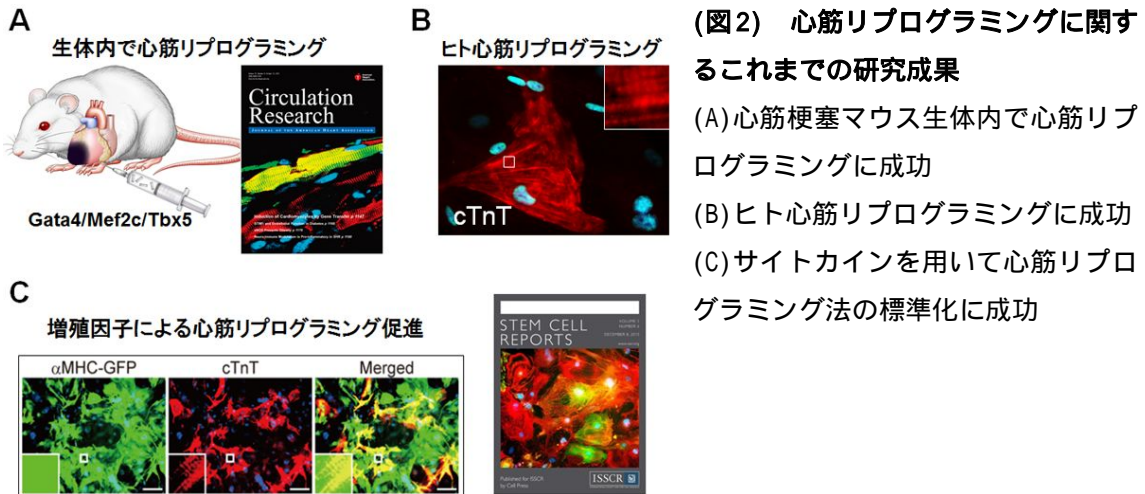
幹細胞は増殖能・多分化能を有する心臓前駆細胞を経て、心筋、血管内皮、平滑筋細胞など心臓構成細胞に分化する。心筋細胞は終末分化細胞であり、心臓障害後に心筋は再生せず線維化し心不全に至る (Ieda et al, Dev Cell 2009)。心臓再生法として幹細胞由来の心筋細胞を移植する方法があるが、複数のサイトカインや化合物を使用する従来の心筋分化誘導法は煩雑であり、分化メカニズムも不明な点が多い。また幹細胞混入による腫瘍形成の可能性や移植心筋の生着が困難などの課題もある。一方、ダイレクトリプログラミングは病変部で目的の細胞を直接作製する再生法であり、1. 単純・簡便・低コスト、2. 幹細胞を経由せず腫瘍形成しない、3. 細胞移植が必要ないなど多くの利点があり、従来の心臓再生法の問題を一気に解決できる可能性がある。

1987年に骨格筋の単一のマスター遺伝子 MyoD が発見されたが、体細胞を心筋に転換できる心筋マスター遺伝子は長らく発見されていなかった。我々はこれまでに JST-CREST (平成 27 年度終了、事後評価 A) による研究サポートを受け、世界で初めて心筋特異的な 3 つの転写因子 Gata4, Mef2c, Tbx5 が心筋リプログラミング因子であることを発見した (図 1, Ieda et al, Cell 2010)。また生体内に同因子を導入して病変部の心臓線維芽細胞を直接心筋へ転換して心臓再生できることを示した (Inagawa et al, Circ Res 2012)。ヒト細胞では、Gata4, Mef2c, Tbx5 (GMT) に 2 つの遺伝子 (Mesp1, Myocd) を加えた 5 因子、あるいは miR-133 を加えた 6 因子で心筋リプログラミングできることを示し、さらにそのメカニズムを明らかにした (図 2, Wada et al, PNAS 2013, Muraoka et al, EMBO J 2014)。また特定のサイトカインを添加した細胞培養法を開発して、心筋リプログラミング効率を約 40 倍改善し、心筋リプログラミング法の標準化に世界ではじめて成功した (図 2, Yamakawa et al, Stem Cell Reports 2015)。これら心筋リプログラミングに関する一連の研究成果は国際的にも高く評価されており、海外一流誌から総説などを依頼されている (Muraoka et al., Annu Rev Physiol 2014, Muraoka et al., Circ Res 2015, Sadahiro et al., Circ Res 2015)。



(図 1) 線維芽細胞からの心筋リプログラミング

(A) 心筋誘導因子のスクリーニング (B) GMT により誘導された心筋細胞の免疫染色 (C) 線維芽細胞、誘導心筋細胞、心筋細胞のマイクロアレイデータ (D) 誘導心筋細胞と成体マウス心室筋の活動電位



(図2) 心筋リプログラミングに関するこれまでの研究成果

(A)心筋梗塞マウス生体内で心筋リプログラミングに成功

(B)ヒト心筋リプログラミングに成功

(C)サイトカインを用いて心筋リプログラミング法の標準化に成功

このように心筋リプログラミング研究は着実に進展しているが、これまでの心筋リプログラミング法は血管内皮や平滑筋細胞など心筋以外の心臓構成細胞を作製できず、また誘導した心筋細胞も増殖しないという課題があった。またこれまで体細胞を心臓前駆細胞に直接リプログラミングできるマスター因子は同定されていない。もし増殖能・多分化能を有する心臓前駆細胞リプログラミング因子を発見できれば、革新的な心臓再生法を創出できる。さらに幹細胞から従来のサイトカインや化合物を使用せずに、リプログラミング因子による簡便で効率的な新しい心筋誘導法を開発できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、線維芽細胞から増殖能・多分化能を有する心臓前駆細胞を直接誘導できる新規心臓前駆細胞リプログラミング因子を同定する。さらに同因子を用いて幹細胞から簡便・効率的・低コストな新しい心筋誘導法を確立する。またこれまで不明であった心臓前駆細胞誘導の分子制御機構を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 新規心臓前駆細胞リプログラミング因子のスクリーニングと同定

分担研究者の産業技術総合研究所・五島先生から供与される世界最多の cDNA ライブラリーを用いて心臓前駆細胞リプログラミング因子のスクリーニングを行う。

### (2) 誘導心臓前駆細胞の遺伝子発現と機能解析

線維芽細胞からリプログラミングにより作製した誘導心臓前駆細胞の性質を明らかにするため、遺伝子発現や生理機能を解析する。

### (3) 心臓前駆細胞リプログラミング因子を用いたマウス幹細胞からの分化誘導

多能性幹細胞から従来の複数のサイトカインを使用せずに、心臓前駆細胞リプログラミング因子を用いて効率的に心臓前駆細胞や心筋細胞を含む心臓構成細胞に分化誘導することが可能か検討する。

### (4) リプログラミング因子による心臓前駆細胞誘導の分子メカニズム解明

リプログラミング因子による心臓前駆細胞誘導の分子メカニズムを解明するため、3. で作製した Dox システムを用いて遺伝子発現の変化を網羅的に解析する。

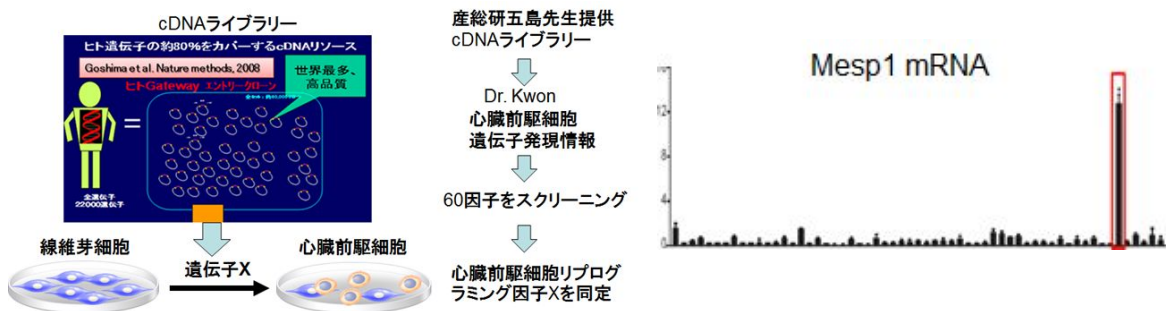
### (5) 心臓前駆細胞リプログラミング因子を用いたヒト細胞からの分化誘導

上記マウス研究で同定した心臓前駆細胞リプログラミング因子をヒト細胞に遺伝子導入して、心臓前駆細胞や心筋細胞への分化誘導を解析する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 新規心臓前駆細胞リプログラミング因子のスクリーニングと同定

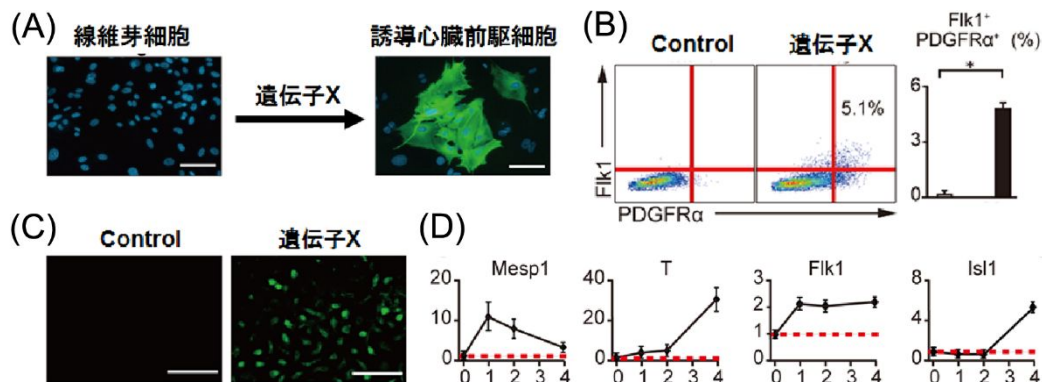
分担研究者の産業技術総合研究所・五島先生から供与される世界最多の cDNA ライブラリーを用いて心臓前駆細胞リプログラミング因子のスクリーニングを行った(図 3)。候補因子は心臓発生過程において、心臓前駆細胞が出現する時期特異的に発現が上昇する転写因子で、かつノックアウトマウスの表現型で心臓の発生異常・胎生致死などをきたす機能的に重要な遺伝子 60 個を候補因子とする。これまでの実験で、新規心臓前駆細胞リプログラミング因子 Tbx6 を同定した(図 3)。



(図 3) cDNA ライブラリーを用いた心臓前駆細胞リプログラミング因子の同定 (左図) 心臓前駆細胞リプログラミング因子のスクリーニング(右図)心臓前駆細胞遺伝子 Mesp1 を誘導する遺伝子 Tbx6 (赤) を同定

##### (2) 誘導心臓前駆細胞の遺伝子発現と機能解析

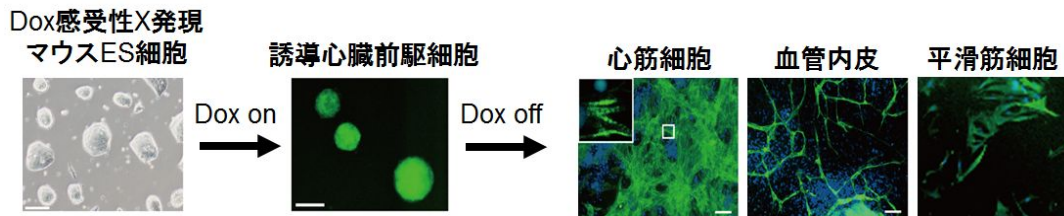
心臓前駆細胞およびそこから派生する娘細胞を GFP でラベルできる Mesp1-Cre/GFP-flox マウスのシステムを用いて、心臓前駆細胞の誘導を確認した。心臓前駆細胞リプログラミング因子 Tbx6 により線維芽細胞から心臓前駆細胞が誘導される経時的な遺伝子発現変化を QRT-PCR で、心臓前駆細胞特異的蛋白の発現を FACS や免疫染色で確認した。これまでに Mesp1-Cre/GFP-flox マウス線維芽細胞に心臓前駆細胞リプログラミング因子 Tbx6 を遺伝子導入したところ、GFP を発現する心臓前駆細胞を誘導できた。また誘導心臓前駆細胞は Mesp1, T, Flk1/PDGFR $\alpha$ など複数の心臓前駆細胞特異的遺伝子を発現していることを FACS、免疫染色、QRT-PCR で確認した(図 4)。さらに、誘導心臓前駆細胞が拍動する心筋細胞や血管平滑筋細胞などに分化することも見出している。



(図 4) 線維芽細胞から誘導心臓前駆細胞へ直接リプログラミング

##### (3) 心臓前駆細胞リプログラミング因子を用いたマウス幹細胞からの分化誘導

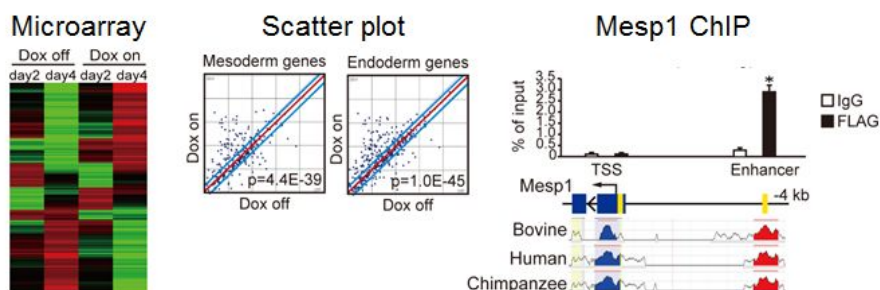
これまでに、Dox 制御性心臓前駆細胞リプログラミング因子 Tbx6 発現 T-GFP マウス ES 細胞株を樹立しており、サイトカインを使用せずに Dox 添加のみで、従来法と同程度の高効率な心臓前駆細胞誘導に成功した(図 5)。さらに Dox を培養液から除いてリプログラミング因子の発現を off にすることで、誘導心臓前駆細胞が効率的に拍動する心筋細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞の 3 系統の心臓構成細胞に分化することも確認した。



(図 5) Dox 投与によりマウス ES 細胞から心臓前駆細胞、心筋、血管内皮、平滑筋細胞を誘導

#### (4) リプログラミング因子による心臓前駆細胞誘導の分子メカニズム解明

心臓前駆細胞リプログラミング因子の発現を on にして 2、4 日後に全遺伝子発現をマイクロアレイ、GO term 解析、Scatter plot 解析などで検討して、心臓前駆細胞リプログラミング因子が制御する遺伝子群を明らかにした。さらに心臓前駆細胞リプログラミング転写因子が直接結合するターゲット遺伝子を免疫クロマチン沈降(ChIP assay)や Luciferase assay で同定する。これまでの実験で、マイクロアレイや Scatter plot 解析より、心臓前駆細胞リプログラミング因子発現により中・内胚葉系の遺伝子群が上昇し、外胚葉系遺伝子群が抑制されることが分かった。さらに心臓前駆細胞リプログラミング因子が心臓分化誘導の鍵遺伝子である Mesp1 や BMP4 のエンハンサー領域に直接結合して遺伝子発現を制御することを見出した(図 6)。



(図 6)心臓前駆細胞リプログラミング因子による分化誘導メカニズムの解明

#### (5) 心臓前駆細胞リプログラミング因子を用いたヒト細胞からの分化誘導

上記マウス研究で同定した心臓前駆細胞リプログラミング因子 Tbx6 をヒト iPS 細胞に遺伝子導入したところ、心臓前駆細胞が誘導され、その後に心筋や血管系細胞に分化誘導できることを確認した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 IEDA MASAKI	4. 巻 26
2. 論文標題 Key Regulators of Cardiovascular Differentiation and Regeneration: Harnessing the Potential of Direct Reprogramming to Treat Heart Failure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cardiac Failure	6. 最初と最後の頁 80 ~ 84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cardfail.2019.09.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sadahiro Taketaro, Ieda Masaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Direct Cardiac Reprogramming for Cardiovascular Regeneration and Differentiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Keio Journal of Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2302/kjm.2019-0008-0A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Haginiwa Sho, Sadahiro Taketaro, Kojima Hidenori, Isomi Mari, Tamura Fumiya, Kurotsu Shota, Tani Hidenori, Muraoka Naoto, Miyake Noriko, Miyake Koichi, Fukuda Keiichi, Ieda Masaki	4. 巻 513
2. 論文標題 Tbx6 induces cardiomyocyte proliferation in postnatal and adult mouse hearts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1041 ~ 1047
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.04.087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 1.Miyamoto K, Akiyama M, Tamura F, Isomi M, Yamakawa H, Sadahiro T, Muraoka N, Kojima H, Haginiwa S, Kurotsu S, Tani H, Wang L, Qian L, Inoue M, Ide Y, Kurokawa J, Yamamoto T, Seki T, Aeba R, Yamagishi H, Fukuda K, Ieda M	4. 巻 22
2. 論文標題 Direct In Vivo Reprogramming with Sendai Virus Vectors Improves Cardiac Function after Myocardial Infarction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell.	6. 最初と最後の頁 91 ~ 103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2017.11.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kurotsu Shota, Osakabe Rina, Isomi Mari, Tamura Fumiya, Sadahiro Taketaro, Muraoka Naoto, Kojima Hidenori, Haginiwa Sho, Tani Hidenori, Nara Kaori, Kubota Yoshiaki, Ema Masatsugu, Fukuda Keiichi, Suzuki Takeshi, Ieda Masaki	4. 巻 495
2. 論文標題 Distinct expression patterns of Flk1 and Flt1 in the coronary vascular system during development and after myocardial infarction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 884-891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.11.094	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kurotsu S, Suzuki T, Ieda M	4. 巻 23
2. 論文標題 Direct Reprogramming, Epigenetics, and Cardiac Regeneration.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Card Fail.	6. 最初と最後の頁 552-557.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cardfail.2017.05.009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Umei TC, Yamakawa H, Muraoka N, Sadahiro T, Isomi M, Haginiwa S, Kojima H, Kurotsu S, Tamura F, Osakabe R, Tani H, Nara K, Miyoshi H, Fukuda K, Ieda M	4. 巻 18
2. 論文標題 Single-Construct Polycistronic Doxycycline-Inducible Vectors Improve Direct Cardiac Reprogramming and Can Be Used to Identify the Critical Timing of Transgene Expression.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E1805
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18081805.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sadahiro Taketaro, Isomi Mari, Muraoka Naoto, Kojima Hidenori, Ieda Masaki	4. 巻 23
2. 論文標題 Tbx6 Induces Nascent Mesoderm from Pluripotent Stem Cells and Temporally Controls Cardiac versus Somite Lineage Diversification	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 382 ~ 395.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2018.07.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Masaki Ieda
2. 発表標題 Making New Muscle Cells from Fibroblasts for Heart Regeneration
3. 学会等名 The KAST-NAMOK joint International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaki Ieda
2. 発表標題 Direct Reprogramming for Cardiovascular Regeneration
3. 学会等名 CSSCR annual session (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaki Ieda
2. 発表標題 Direct reprogramming and cardiovascular research
3. 学会等名 AHA BCVS 2019 Scientific Sessions Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaki Ieda
2. 発表標題 Direct Reprogramming toward Cutting-edge Cardiovascular Research
3. 学会等名 Gwangju-International Interventioanl Cardiology Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Masaki Ieda
2. 発表標題 Direct Cardiac Reprogramming and Heart Regeneration
3. 学会等名 Yonsei Stem cell and Cardiovascular Regeneration Symposium 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masaki Ieda
2. 発表標題 Mechano-transduction and Direct Cardiac Reprogramming for Heart Regeneration
3. 学会等名 International symposium on mechanobiology with its cutting edge and diversity (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masaki Ieda
2. 発表標題 Direct Cardiac Reprogramming, Cell Fate Decision, and Heart Regeneration
3. 学会等名 The 27th Hot Spring Harbor International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masaki Ieda
2. 発表標題 Direct Reprogramming and Cardiac Regeneration
3. 学会等名 Cell Press Lab Links 「Stem cells」 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	五島 直樹  (Goshima Naoki)  (70215482)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究 チーム長    (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------