

心筋直接誘導におけるエピジェネティック制御機構の解明

村岡直人

慶應義塾大学医学部 循環器内科

【研究の背景】

心筋細胞は終末分化細胞で再生できないため、心臓は一度障害を受けると線維芽細胞の増殖により線維化し心機能は低下する。iPS 細胞をはじめとした幹細胞は心筋再生の細胞源として期待されるが、その使用には分化誘導効率、腫瘍形成の可能性、移植細胞の生着率など問題がある。心臓内在性の線維芽細胞を直接その場で高率に心筋に転換できればこれらの問題を解決できる。そこで、心臓に内在する線維芽細胞に心筋特異的転写因子を導入することで、直接その場で心筋細胞を誘導する新規の心筋再生法を確立した¹⁾。心臓発生に重要な複数の心筋特異的転写因子 (Gata4/ Mef2c/ Tbx5: GMT) の同時導入で、iPS 細胞を介さずに線維芽細胞が直接心筋様細胞に転換できることをマウス in vitro で報告し、その後マウス in vivo、ヒト in vitro と誘導技術は心筋再生医療実現に向けて着実に進歩してきた^{1), 2), 3)}。また、従来の心筋特異的転写因子に心筋で高発現する microRNA である miR-133 を加えることでマウス及びヒト線維芽細胞から短期間で効率的な誘導を可能とし、さらには miR-133 により上皮間葉移行のマスター遺伝子である Snai1 が抑制され、線維芽細胞の特性が消去されることで心筋誘導が促進するという心筋直接誘導の分子基盤を同定した⁴⁾。しかし、その分子基盤は依然不明な点もあり、特にエピジェネティック制御機構に関しては検討がなされていない。

【目 的】

本研究ではこれまで不明であった心筋直接誘導におけるエピジェネティック制御機構を明らかにする。これより得られた知見を基に、心筋リプログラミングを阻害するエピジェネティックな障壁を取り除くことで線維芽細胞からの効率的な心筋誘導法確立を目指す。

【方法及び結果】

1) 線維芽細胞からの心筋直接誘導における心筋細胞・線維芽細胞関連遺伝子の発現量の変化

心筋細胞のみ緑色蛍光蛋白 (green fluorescent protein: GFP) を発現する α myosin heavy chain (α MHC) -GFP 遺伝子改変マウスの胎児線維芽細胞に心筋誘導因子である GMT を導入し、誘導された α MHC-GFP 陽性細胞を FACS で選別する。線維芽細胞と比較し、GMT 導入後 3 日ですでに線維芽細胞遺伝子の発現低下・心筋遺伝子の発現上昇を認めた。GMT 導入直後からの継時的な遺伝子発現を RNA-seq で比較検討し、誘導初期の発現の変化を明らかにする。これまでに、qRT-PCR では Myh6 等の心筋遺伝子の発現上昇が緩徐である一方、Col1a1 等の線維芽細胞遺伝子の抑制は早期から顕著であることを確認した。

2) 心筋直接誘導における各種遺伝子のヒストン修飾の継時的变化

エピジェネティック変化は遺伝子発現の変化に先行すると考えられることから、線維芽細胞と GMT 導入後早期の誘導心筋細胞で ChIP-seq を行い、ヒストン修飾を網羅的に解析する。差の認められる線維芽細胞関連遺伝子及び心筋細胞関連遺伝子でのヒストン修飾を選別し、その変化を ChIP-qPCR で継時的に解析する。RNA-seq で同定した mRNA の継時的な遺伝子発現の変化に重ね合わせることで、遺伝子に先行するエピジェネティック変化を示す。これまでの研究で ChIP-qPCR により誘導心筋細胞の心筋細胞遺伝子での H3K4 メチル化、H3K27 脱メチル化を同定した。

3) 各種遺伝子のプロモーター領域における DNA メチル化状態の変化

線維芽細胞と誘導心筋細胞で線維芽細胞・心筋細胞遺伝子のプロモーター領域における DNA メチル化・脱メチル化をバイサルファイトシークエンス法で解析する。これまでの実験で、GMT 導入後 1 か月の誘導心筋細胞では生体内心筋細胞と同様に Myh6、Nppa 等の心筋特異的遺伝子のプロモーター領域における脱メチル化を認めた。今後は、線維芽細胞・心筋細胞遺伝子のメチル化・脱メチル化の継時的な変化を明らかにする。遺伝子発現、ヒストン修飾及び DNA メチル化状態の継時的な変化を解析することで、心筋直接誘導でのエピジェネティック制御機構が明らかとなる。中でも、誘導初期に起きる変化は根幹を担う重要なメカニズムと推測される。

4) エピジェネティック制御因子導入による心筋直接誘導の効率改善

解明した心筋直接誘導初期のエピジェネティック変化を誘導することにより誘導効率が改善することを確認する。エピジェネティックな障壁を除去することにより目的のヒストン修飾を誘導し、FACS を用いて心筋誘導効率を解析する。また、qRT-PCR・蛍光免疫染色により遺伝子・蛋白発現を確認し、電気生理学的検査により機能的な成熟を評価する。

【考察及び臨床的意義・臨床への貢献度】

本邦では心臓移植のドナー不足の問題から重症心不全に対する新規治療として心臓再生医療が求められている。臨床応用実現のためには、安全で効率的な再生法が必須であり、心筋直接誘導法により安全面での問題は解決する可能性がある。また、本研究ではこれまで心筋直接誘導におけるエピジェネティック変化を一部同定しており、その詳細が解明されることでエピジェネティック制御因子による効率的な心筋直接誘導を確立できると考えられる。さらに、そのエピジェネティック制御機構は他の細胞の直接誘導にも共通するメカニズムの可能性があることから、これまで直接誘導が困難ないしは効率が低いとされた細胞種に対しても応用することで、再生医療全体への大きな波及効果が期待できる。

【参考・引用文献】

- 1) Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, Srivastava D.
Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors.
Cell .;142(3):375-386, 2010 Aug 6
- 2) 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(9):1147-56, 2012 Oct 12
- 3) 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, Aeiba R, Yozu R, Yamagishi H, Kitamura T, Fukuda K, Ieda M.
Induction of Human Cardiomyocyte-like Cells from Fibroblasts by Defined Factors.
Pro Natl Acad Sci USA.;110(31):12667-72, 2013 Jul 30
- 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, Aeiba R, Yamagishi H, Fukuda K, Ieda M.
MicroRNA-133 Promotes Direct Cardiac Reprogramming by Snail Repression and Silencing Fibroblast Signatures.
EMBO J.; 33(14):1565-81, 2014 Jul 17