

## 安全かつ効率の良い心筋直接リプログラミングによる心臓再生法の開発

家田真樹

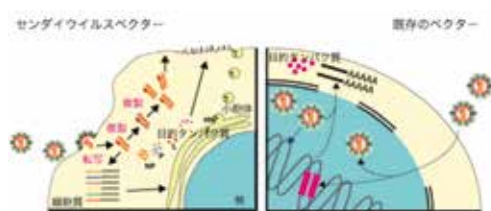
慶應義塾大学 医学部・循環器内科

## 【研究の背景】

心臓病は死亡原因の中で常に上位を占める疾患であり新しい治療法の開発が望まれている。心筋細胞は終末分化細胞で再生できないため、心筋障害後は線維芽細胞の増殖により線維瘢痕化し心不全に至る(Ieda et al, Dev Cell, 2009)。現在心臓再生医療は未来の治療として期待されており iPS 細胞はその有力な細胞源として活発に研究が行われているが、一度線維化してしまった組織を元に戻すような治療法はない。我々は心臓線維芽細胞を生体内において直接心筋細胞へ分化転換できれば新しい心臓再生治療につながる可能性があると考え研究を開始した。これまでに *in vitro* の実験で心臓発生に重要な 3 つの転写因子(Gata4、Mef2c、Tbx5、以下 GMT)の同時導入により、マウス線維芽細胞を iPS 細胞を介さずに直接心筋様細胞に転換することに成功した(Ieda et al, Cell, 2010)。また急性心筋梗塞モデルマウスを用いた *in vivo* の研究では心臓に GMT を直接導入して内在性心臓線維芽細胞を心筋様細胞に生体内で転換することに成功した(Inagawa et al, Circ Res, 2012)。さらにヒトでは Gata4、Mef2c、Tbx5 に 2 つの遺伝子(Mesp1、Myocd)を加えた 5 因子、あるいはさらに miR-133 を加えた 6 因子で心筋直接リプログラミングすることに世界に先駆けて成功している(Wada et al, PNAS 2013, Muraoka et al, EMBO J 2014, Sadahiro et al, Circ Res, 2015)。今後この新しい心臓再生法を真に臨床応用するためには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が急務である。

## 【目 的】

本研究では、non-integration ベクターであり安全に遺伝子を高発現することが可能なセンダイウイルスベクターを使用し、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)。



(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

## 【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最適な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定量的 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細胞を直接誘導

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 $\alpha$ MHC-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分化転換を FACS で定量的に解析することが可能である。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

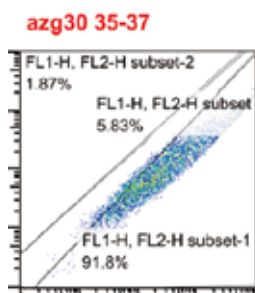
線維芽細胞からセンダイウイルスベクターにより誘導される心筋細胞の蛋白発現を免疫染色などで確認する。また誘導心筋細胞を $\alpha$ MHC-GFPをマーカーとして FACS で選別し、遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ、qRT-PCR などにより培養心筋細胞、線維芽細胞と比較する。また誘導心筋細胞の Ca イメージング、パッチクランプなどを行い、心筋細胞に特徴的な生理機能を持つか検討する。

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ブロット法、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定量的 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。

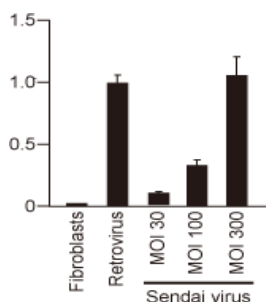
【結果】

(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)。



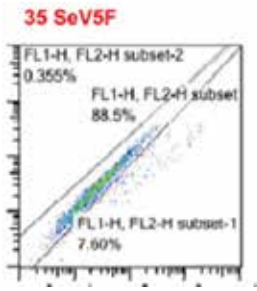
(図 2)センダイウイルスの感染効率  
MOI30 で 91%の感染効率



(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

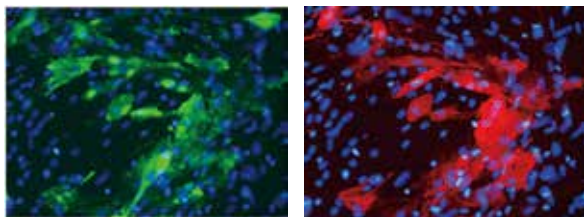
これまでの実験でセンダイウイルスの感染温度は 35 度オーバーナイト処理が 37 度より優れていること、心筋の誘導効率  
はレトロウイルスと比べ遜色ないことを確認している。GMT の感染により 7%程度の心筋リプログラミングが得られた(図 4)。



(図 4)センダイウイルスでの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αMHC-GFP および心筋マーカーであるα-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 濃度変化を観察できた。今後さらに詳細な生理機能の解析を経時的に行う。



(図 5)センダイウイルスでの心筋リプログラミングの免疫染色データ  
αMHC-GFP (緑、左)、α-actinin (赤、右)の発現を確認した

【考察】

これまでに外来遺伝子を 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海外も含めて報告さ  
れておらず、本研究は世界ではじめての安全性の高い心筋リプログラミング報告となる。今後さらに詳細な誘導心筋の機能  
解析、心筋リプログラミングの分子メカニズム解析などを通して、安全かつ効率の良い心筋直接リプログラミングによる心臓再  
生法を確立する。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

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、再生医療実現と臨床への応用が大いに期待で  
きる(図 6)。また本法は細胞移植の必要がなく、iPS 細胞由来心筋を移植する再生法の抱える課題である、1.長期間・コスト  
高、2.iPS 細胞混入による腫瘍形成の可能性、3.移植細胞の生着が難しい、などの複数の課題を一気に解決できる可能性  
がある。



(図 6)未来の心臓再生医療(上が iPS 使用、下  
が心筋直接誘導法)

【参考・引用文献】

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.
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.
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.
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 *Snai1* and silencing fibroblast signatures. *EMBO J*. 17:33(14):1565-81, 2014. doi: 10.15252/embj.201387605.
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.