

## ケミカル・ダイレクト・リプログラミングによる新規ヒト心筋細胞誘導法の開発

武田行正

京都府立医科大学大学院医学研究科 細胞再生医学

### 【研究の背景】

重症心不全の患者に対し、心機能の回復を目的として、シート状などに加工した心筋細胞を移植する試みが始まろうとしている。これには、主として iPS 細胞から分化させた心筋細胞の使用が予定されているが、その初期化(リプログラミング)にはおよそ半年以上の期間がかかりコストも膨大であるため、自家の細胞を治療のため用いることは現実的でない。また分化誘導後、残留する未分化の細胞による腫瘍化のリスクが存在し、特に長期間にわたり体内に残留する細胞移植治療ではこの腫瘍化のリスクが、臨床試験を実施する上で無視できない問題の一つとなっている<sup>1)</sup>。ダイレクトリプログラミングは、体細胞から iPS 細胞のような多能性の状態を経ずに別の種類の細胞へ変換する現象であり、一般的にウイルスベクターを用いて複数の転写因子を過剰発現させることで可能としてきた。しかし、遺伝子の導入によって予期しないゲノム DNA の変異や挿入が起こる可能性は避けられない。このような背景から、細胞移植治療のため自家の体細胞から遺伝子の導入を避け、より安全な心筋細胞が短期間に調製される必要がある<sup>2)</sup>。

### 【目 的】

本研究は、遺伝子の導入を行わず、種々のシグナル伝達経路を制御する低分子化合物を同時に組み合わせることによって、ヒト体細胞から心筋細胞へのダイレクトリプログラミングを目的とする。低分子化合物を用いて、患者本人の線維芽細胞から腫瘍化のリスクがより低いと想定される心筋細胞を迅速に調製することができれば、心筋梗塞などの重症心不全に対する細胞移植治療において最適な細胞のリソースとなりうる。また創薬研究だけでなく、自家の心筋様細胞を用いた薬理試験や毒性試験が可能であり、個別化医療でも利用されることが期待される。

### 【方 法】

本研究では、細胞の分化・リプログラミングに中心的な役割を果たすシグナル伝達経路を、複数の低分子化合物を組み合わせることによって同時に制御し、ヒト皮膚由来線維芽細胞から低分子化合物誘導性心筋細胞 (ciCMs: chemical compound-induced cardiomyocytes) へダイレクトリプログラミングすることを目指す。我々の研究室から報告した神経細胞の直接誘導を可能とする 6 種類の低分子化合物に加え、心筋細胞の機能維持および分化誘導に重要であると報告されている、あるいはその可能性のある化合物を候補として詳細に検討した。誘導された心筋様細胞について、細胞の形態や自発的な収縮運動を観察し、また心筋細胞に特異的な遺伝子の発現を iPS 細胞由来の心筋細胞と比較することで、誘導の程度や細胞の状態を評価した。

### 【結 果】

心筋細胞の分化培地の組成および候補となる化合物の組み合わせを検討した結果、数週間でヒト皮膚線維芽細胞から自発的に収縮する細胞へ誘導する 5 種類の化合物の組み合わせを同定できた。この心筋様細胞では、心筋前駆細胞および心筋細胞に特異的な遺伝子の発現が上昇しており、また免疫染色により  $\alpha$ -Actinin の発現が一部の細胞で確認された。し

かし、iPS細胞由来の心筋細胞などと比較し、細胞の形態や動き方、また遺伝子の発現量が不十分であった。より完全な心筋細胞へ誘導するため、さらに化合物の増減を繰り返した結果、最終的に 8 種類程度の化合物を組み合わせることにより、効率的かつ迅速に心筋様細胞を誘導することができた。

## 【考 察】

ヒト皮膚由来線維芽細胞から、遺伝子の導入を行わず、低分子化合物のみで誘導される心筋様細胞は、自発的に収縮するというユニークな特徴とともに、心筋細胞に特異的な遺伝子の発現が増加していた。しかし、iPS細胞由来の心筋細胞と比較すると、これら遺伝子の発現量は低く、また自発的な収縮運動の頻度や速度が十分ではなかった。これらの結果から、完全な心筋細胞へ誘導するには、成熟化の過程が必要であると考えられる。特に、iPS細胞由来心筋細胞の培養上清には成熟化に必要な成長因子や代謝物などが含まれている可能性が高く、誘導後の心筋様細胞をこの培養上清を用いて培養することで、現在、成熟化を検討している。今後、より効果的な成熟化のため、低分子化合物、サイトカイン、培養プロトコールなどを引き続き検討する予定である。また、心筋様細胞の誘導に必要な化合物が制御するいくつかのシグナル伝達経路に対し、同様の効果が期待される異なる化合物や、その上流や下流に位置するリン酸化酵素の阻害剤についても検討し、完全な心筋細胞の誘導を目指す。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究により、ヒト成人皮膚由来線維芽細胞から複数の低分子化合物を用いて、心筋細胞の部分的なダイレクトリプログラミングに成功した。これは、より腫瘍化のリスクの少ない心筋細胞を調製するという研究目標にとって大きな前進である。また、部分的に誘導された心筋様細胞は、成熟した心筋細胞より生着しやすい可能性があり、生着後、完全な心筋細胞へ成熟が進む可能性も考えられる。これから心筋様細胞の成熟化の検討と共に、動物実験による検証を経て、将来的な臨床応用につながることを期待される。

## 【参考・引用文献】

1. Takeda Y., Harada Y., Yoshikawa T., and Dai P. Chemical compound-based direct reprogramming for future clinical applications. *Biosci. Rep.*, **38**, BSR20171650 (2018)
2. Takeda Y., Harada Y., Yoshikawa T., and Dai P. Direct conversion of human fibroblasts to brown adipocytes by small chemical compounds. *Sci. Rep.*, **7**, 4304 (2017)