

直接リプログラミングによる心臓中胚葉細胞誘導法の確立と心臓再生医療への応用

貞廣威太郎

筑波大学医学医療系 循環器内科

【研究の背景】

線維芽細胞に心筋特異的転写因子を導入し、心筋細胞を誘導する心筋直接リプログラミング法は iPS 細胞を用いた心臓再生が抱える課題を解決するため開発された。しかし誘導された心筋細胞には増殖能がなく、心筋再生のためには十分な細胞数が得られない可能性がある。心臓中胚葉細胞は心臓全体の幹細胞であり、自己複製能を有する。

【目 的】

本研究では、我々が発見した多能性幹細胞からの心臓中胚葉誘導因子 Tbx6 の知見を応用し、線維芽細胞から心臓中胚葉細胞を直接作製する、心臓中胚葉細胞直接リプログラミング法を開発する。

【方 法】

1. Tbx6 による線維芽細胞からの心臓中胚葉リプログラミングの検討

マウス胎児線維芽細胞に Tbx6 遺伝子を導入し、心臓中胚葉細胞を誘導する。

2. 心臓中胚葉からの心血管系分化を定量的に観察できる系統追跡システムの確立

心臓中胚葉細胞と、そこから分化した全ての細胞が GFP を発現する遺伝子改変マウス (Mesp1-Cre/GFP-loxP マウス) を用いる。このシステムにより誘導した心臓中胚葉からの心筋細胞分化の経時的な解析が可能となる。

3. 心筋誘導を促進する細胞の足場の固さを検証する実験系の確立

心筋誘導を改善する目的で、生体内の環境を再現する。生体内は培養皿と比較し、約 10 万分の 1 の柔らかさである。この環境を再現するため、ハイドロゲルを用いた培養系を構築し、任意の硬さの足場を再現できる実験系を確立する。

【結 果】

1. Tbx6 は線維芽細胞から心臓中胚葉細胞を誘導する

マウス胎児線維芽細胞に Tbx6 遺伝子を導入したところ、心臓中胚葉マーカー遺伝子が誘導され、長期にわたって発現が維持されていた。分化が進んだ心臓前駆細胞・胎児心筋に発現する遺伝子群は誘導されておらず、心血管系細胞への分化には Tbx6 以外に、心血管系への誘導を促進する遺伝子の追加が必要であることが示唆された。検討の結果、Tbx6 に加えて 2 つの因子を導入することで、一過性の心臓中胚葉遺伝子の上昇の後に、より分化した遺伝子群の上昇を認めた。遺伝子改変マウスの線維芽細胞を用いた検討では、一部の心筋細胞では、誘導した心臓中胚葉細胞から心筋細胞が分化したことが示された。一方で、その誘導効率は低く、心筋誘導を促進する必要があった。

2. 心筋誘導を促進する柔らかい足場の発見と、分子生物学的機序の解明

これまでの先行研究の成果より、生体内でリプログラミングされた心筋細胞はより成熟した性質を持っていることがわかっている。我々は生体内の環境として、細胞周囲の足場の硬さに着目した。この環境を再現するため、我々はハイドロゲルを用いた培養系を構築し、任意の硬さの足場を再現できる実験系を確立した。心筋誘導効率は、硬い培養皿よりも足場が柔らか

くなると改善することが判明し、その分子生物学機序がインテグリンシグナルを介した YAP/TAZ の抑制であることを明らかにした。

【考 察】

心臓中胚葉誘導因子 Tbx6 により、線維芽細胞から心臓中胚葉細胞を誘導することに成功したが、効率的な心血管系への誘導には更なる因子の改良や、環境への介入が必要だと考えられた。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

心臓再生のソースとして期待される心臓幹細胞には、生体から細胞を収集し、維持・培養することが困難、という課題が存在する。一方で、我々は直接リプログラミングにより、iPS 細胞の様に生体内には存在しない細胞をも作製することが可能となった。発生学的な観点からは、心臓中胚葉細胞は心臓内のほぼ全ての細胞へと分化できるため、左心室・右心室・心房など、心臓内の各領域の細胞を選択的に誘導することを目的とした場合、心臓中胚葉細胞は非常に汎用性が高く、心臓再生医療にとって魅力的なソースとなる。

【参考・引用文献】

Soft Matrix Promotes Cardiac Reprogramming via Inhibition of YAP/TAZ and Suppression of Fibroblast Signatures.
Kurotsu S, Sadahiro T, Fujita R, Tani H, Yamakawa H, Tamura F, Isomi M, Kojima H, Yamada Y, Abe Y, Murakata Y, Akiyama T, Muraoka N, Harada I, Suzuki T, Fukuda K, Ieda M. Stem Cell Reports. 2020 Sep 8;15(3):612-628.