

Banyu Foundation Research Grant 2013—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <概要>

所 属	学校法人慶應義塾大学
氏 名	家田 真樹
研究テーマ	直接リプログラミングによる心筋再生と新しい心筋梗塞治療法の開発

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを1ページにまとめてください。(図表、写真などの貼付を含む)

研究目的

重症心不全をはじめとした心臓病は我が国における死因の常に上位を占めており、新しい治療の開発が急務である。心臓再生は心臓病の新しい治療法として脚光を集めており、iPS細胞などの幹細胞を用いた細胞移植法は期待されているが、その使用には幹細胞混入による腫瘍形成の可能性、移植細胞の長期生着の問題、周囲の心筋組織との電気的結合など様々な課題が指摘されている。これに対して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。これまでに我々は世界で初めてマウス心筋リプログラミング因子として心筋特異的な3つの転写因子(Gata4, Mef2c, Tbx5, 以下GMT)を同定した(Ieda et al, Cell, 2010)。またマウス心筋梗塞モデルにGMTを導入して生体内で心臓線維芽細胞を心筋に転換できること(Inagawa et al, Circ Res, 2012)、さらにヒトではGMTに2因子(Mesp1, Myocd)を加えた5因子がヒト心筋リプログラミング因子であることを世界に先駆けて報告した(Wada et al, PNAS, 2013)。以上のように心筋リプログラミング研究は急速に発展しているが、今後の課題としては心筋リプログラミング効率のさらなる改善、リプログラミングの分子機構解明などが重要である。そこで本研究では、(1) 心筋特異的マイクロRNAを同定して、マイクロRNAによる心筋リプログラミング効率のさらなる改善を目指す。さらに、(2) 細胞外シグナル分子のなかで心筋リプログラミングを促進する因子を同定し、心筋リプログラミングの分子制御機構を解明することを研究目的とした。

研究手法と主な成果**1. マイクロRNAによる心筋リプログラミング促進と分子基盤解明**

心筋特異的マイクロRNAの中から心筋リプログラミングを促進するマイクロRNAとしてmiR-133を同定することに成功した。miR-133はヒト心筋リプログラミングを約10倍改善した。さらにその分子メカニズム解明のため誘導心筋細胞の遺伝子発現を解析したところ、miR-133は線維芽細胞遺伝子を抑制していることが分かった。miR-133のターゲット遺伝子を探索したところ、上皮間葉転換のマスター因子であるSnai1が直接の新規ターゲット遺伝子であることがわかった。Snai1の過剰発現、ノックダウン実験で心筋誘導はそれぞれ抑制、促進されることを確認し、miR-133がSnai1の抑制、線維芽細胞の形質抑制を介して心筋リプログラミングを促進する、という新しい分子機構を明らかにし論文発表した(Muraoka et al, EMBO J, 2014)。本研究成果はマスメディアでも報道され大きな反響をよんだ。

2. 細胞外シグナルによる心筋リプログラミング促進と分子機構

本研究では幹細胞から心筋分化の過程で使用されている化合物や細胞増殖因子による心筋リプログラミング効果をスクリーニングした。3つの心筋誘導遺伝子GMT導入したのち、培養液中に化合物を添加した結果、線維芽細胞増殖因子(Fibroblast growth factor, FGF)2、FGF10、血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)の3つの細胞増殖因子(以下FFV)を無血清の細胞培養液に添加することで、従来のウシ血清を用いた方法と比べて約40倍心筋誘導効率を改善することに成功した。またFFVを用いることで、心筋誘導に必要な外来遺伝子を2因子に減らすことに成功し、さらにその分子メカニズムとしてFFVがPI3K/Aktやp38MAPK経路を介して心筋リプログラミング遺伝子Gata4、Gata6、Hand2、Nkx2-5の発現を誘導することを明らかにした。動物由来の血清を使用せず、FGF2、FGF10、VEGFなどのdefined factorsのみで高効率な心筋直接作製法を報告したのは世界初になり、本論文はStem Cell Reports誌の表紙を飾った(Yamakawa et al, Stem Cell Reports, 2015)。

Banyu Foundation Research Grant 2013—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <詳細>

所 属	学校法人慶應義塾大学
氏 名	家田 真樹
研究テーマ	直接リプログラミングによる心筋再生と新しい心筋梗塞治療法の開発

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

目的

心臓病は死亡原因の常に上位を占め、新しい治療の開発が真に望まれる。心臓病治療が難しい理由としては心筋細胞が終末分化細胞であり複製能力がないことが挙げられる。心筋梗塞などの心臓障害後に心筋細胞は再生できないため心機能低下、心不全死につながる。そこで心筋再生医療は心臓病に対する未来の治療として期待されており、iPS 細胞をはじめとした幹細胞はその有力な細胞源として世界中で活発に研究が行われている。しかし幹細胞の使用には分化誘導効率、腫瘍形成の可能性、細胞の生着の問題など様々な問題が指摘されている。我々は心臓内に多数存在する心臓線維芽細胞を直接その場で心筋細胞に転換できたらこれらの問題を解決できる可能性があると考え研究を開始した。

マウス心筋リプログラミング遺伝子の同定では心臓発生に重要な 14 の因子を選びスクリーニングした。心筋細胞のみ GFP を発現する α MHC-GFP トランスジェニックマウスを作製し、GFP 陰性の線維芽細胞にレトロウイルスで 14 因子同時に導入したところ、1-2%の細胞が心筋遺伝子の活性化を意味する α MHC-GFP 陽性細胞に転換した。因子を一つずつ除くことにより最終的に Gata4/Mef2c/Tbx5 (以下 GMT)の 3 つの遺伝子の組み合わせでマウス線維芽細胞を心筋細胞へ直接リプログラミングすることに成功し、この細胞を誘導心筋細胞 (iCM, induced cardiomyocyte)と名付けた(Ieda et al, Cell 2010)。次に心筋リプログラミング遺伝子による生体内心筋リプログラミングを検討した。3 つの心筋リプログラミング遺伝子 (GMT)を個別に作成し混ぜてマウス心臓に遺伝子導入したところ、心筋梗塞部位の内在性心臓線維芽細胞を心筋様細胞に転換することができた。さらにこの実験では 3 因子を同時に発現するポリシストロニックベクターを開発して、このベクターにより成熟した心筋様細胞の誘導効率を2倍に改善できることも示した。以上の結果から心筋リプログラミング因子を適切に遺伝子導入することで、生体内でも心筋梗塞部位の線維芽細胞から心筋様細胞を直接作製できることを明らかにした(Inagawa et al, Circ Res, 2012)。さらにヒト細胞に関してはマウスで有効であった3つの遺伝子 Gata4, Mef2c, Tbx5 のみではヒト細胞の心筋誘導に不十分であることが分かった。そこで新たに心筋細胞特異的に発現している 11 の遺伝子の中からヒト心筋リプログラミングに必須の因子をスクリーニングした。方法として、FACS、定量的 RT-PCR、免疫染色など多方面よりスクリーニングした。その結果、GMT にさらに 2 因子(Mesp1, Myocd)を加え 5 因子(GMTMM)にすることでヒト心筋リプログラミング効率が著明に改善することを見出した。GMTMM により誘導されたヒト心筋様細胞は心筋特異的な遺伝子発現を示し、また心筋に特徴的な生理機能も確認できた(Wada et al, PNAS, 2013)。

この直接リプログラミング法は(1) iPS細胞を経ず心筋細胞のみ作製できる(2) 作製までの時間が短縮し、過程も単純である(3) 臓器再生のために心臓へ細胞移植する必要がなくなるなど大きな利点があり、これまでの心臓再生研究の課題を解決し心筋梗塞の新しい治療法になることが期待できる。以上のように心筋リプログラミング研究は急速に発展しているが、転写因子のみによる心筋誘導は十分とはいえず、またその分子メカニズムは全く不明であった。そこで、本研究では、(1) 心筋特異的マイクロRNAを同定して、マイクロRNAによる心筋リプログラミング効率のさらなる改善を目指した。さらに、(2) 細胞外シグナル分子のなかで心筋リプログラミングを促進する因子を同定し、心筋リプログラミングの分子制御機構を解明することを研究目的とした。

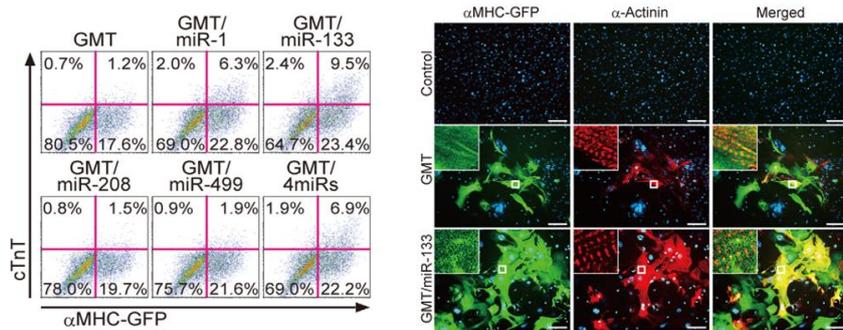
研究方法と研究結果**1. マイクロ RNA による心筋リプログラミング促進と分子基盤解明****(1) 心筋特異的に発現するマイクロ RNA の網羅的解析**

心筋リプログラミングを促進するマイクロ RNA を見出すため、候補因子として心筋特異的に発現するマイクロ RNA を同定した。マイクロアレイの結果、miR-1, miR-133, miR-208, miR-499 の4つの心筋特異

的マイクロ RNA を見出した。

(2) miR-133 が心筋リプログラミングを促進

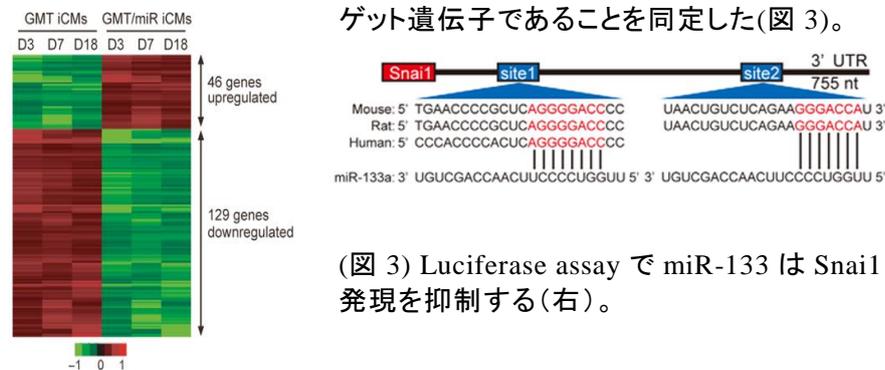
複数の心筋特異的マイクロ RNA の中から心筋リプログラミングを促進するマイクロ RNA を同定した。α-MHC GFP マウス線維芽細胞に Gata4/Mef2c/Tbx5 の 3 因子を導入する際に、同時にマイクロ RNA mimic (miR)を導入して心筋誘導効果を αMHC-GFP、cardiac troponin T (cTnT)の心筋マーカーで FACS により定量的に解析した結果、miR-133 が心筋リプログラミングを 8 倍促進することを見出した(図 1)。生理機能として自律拍動する細胞数は GMT 群と比較して 7 倍に増加し、さらに細胞拍動まで従来 1 か月かかったところをわずか 10 日間で達成し心筋誘導までの期間も短縮できることを見出した。



(図 1) 心筋マイクロ RNA による心筋誘導促進を FACS、免疫染色で解析。

(3) miR-133 は Snai1 を直接抑制して線維芽細胞の形質を抑制する

マイクロ RNA による心筋リプログラミングの制御機構を解明するため、miR-133 導入により発現が変化する遺伝子を網羅的に解析した。GMT あるいは GMT/miR-133 をα-MHC GFP マウスの線維芽細胞に導入して経時的に誘導心筋細胞を FACS で回収して全遺伝子発現をマイクロアレイ法で解析した(図 2)。変化した遺伝子群の特徴を GO term 解析、Pathway 解析、Scatter plot 解析などにより検討した結果、線維芽細胞特異的な遺伝子群が miR-133 により低下していた。またバイオインフォマティクス、Luciferase により上皮間葉転換(線維芽細胞分化)のマスター因子である Snai1 が miR-133 の新規ターゲット遺伝子であることを同定した(図 3)。

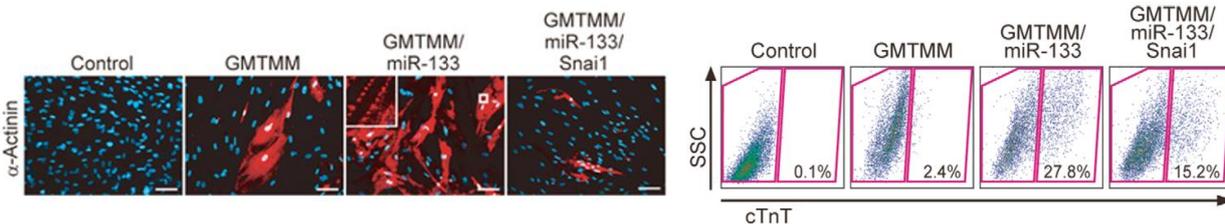


(図 2) マイクロアレイで miR-133 により線維芽細胞関連遺伝子が低下することを確認(左)。

(図 3) Luciferase assay で miR-133 は Snai1 の 5'-UTR に結合して Snai1 発現を抑制する(右)。

(4) miR-133 によるヒト心筋誘導促進

miR-133 をヒト心筋リプログラミングの5因子(Gata4, Mef2c, Tbx5, Mesp1, Myocd)と一緒にヒト線維芽細胞に導入して心筋誘導効果を解析した。その結果ヒトにおいても、miR-133 を加えることで心筋様細胞の誘導が約 10 倍改善した(図 4)。さらにヒト細胞においても miR-133 による Snai1 の抑制と線維芽細胞の特性消失が心筋誘導促進に重要な役割を果たすことがわかった。以上より、心筋誘導遺伝子に筋特異的マイクロ RNA である miR-133 を加えることでマウス及びヒト心臓線維芽細胞から短期間で効率的に心筋様細胞を直接作製することに成功した(Muraoka et al, EMBO J, 2014)。



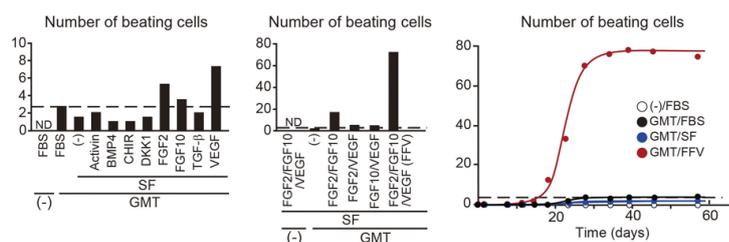
(図 4) ヒト細胞で miR-133 による心筋リプログラミング。心筋誘導が10倍に改善。

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

2. 細胞外シグナルによる心筋リプログラミング促進と分子機構

(1) 心筋誘導を促進する因子のスクリーニングと FGF2/FGF10/VEGF の同定

マウス線維芽細胞から拍動する心筋細胞誘導を促進する化合物を同定するため、これまで幹細胞からの心筋誘導において高い効果を示した小分子化合物やサイトカインをスクリーニングした。Gata4/Mef2c/Tbx5(GMT)を遺伝子導入し、翌日から培養液を無血清培地に変え 8 化合物をスクリーニングし 4 週後に拍動心筋の数を計測した。FGF2, FGF10, VEGF 単独で拍動心筋誘導が改善し、さらに FGF2, FGF10, VEGF をさまざまな組み合わせで投与したところ、FFV すべてを同時に投与した群で著明に心筋誘導が改善した(図 5 左、中)。また時間経過をみたところ、既存の血清を用いる方法に比べて早期より心筋拍動が見られ、最終的に拍動する心筋の数は約 40 倍に増加した(図 5 右)。FFV で得られる誘導心筋細胞を免疫染色法で確認し、様々な心筋蛋白の発現と横紋構造形成を確認した。



(図 5)心筋誘導化合物のスクリーニング

(左)FGF2, FGF10, VEGF で拍動細胞増加 (中) FFV の組み合わせで拍動細胞著明に増加

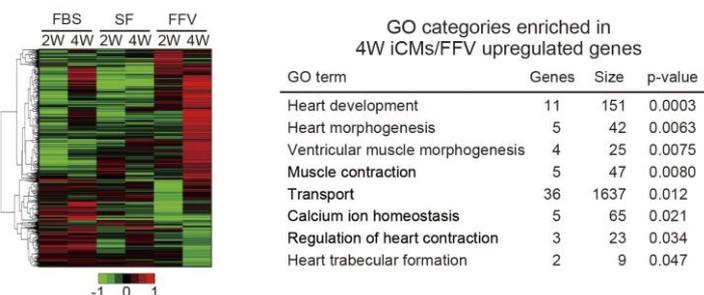
(右)FFV により早期から心筋拍動をとめた

(2) FFV により 2 因子で心筋リプログラミング

これまでの心筋リプログラミングでは Gata4/Mef2c/Tbx5 と3つの転写因子を線維芽細胞に遺伝子導入する必要があった。FFV により心筋誘導が改善したため、導入遺伝子を減らすことが可能か検討した。その結果 Mef2c/Tbx5 の 2 因子のみでも拍動する心筋の誘導が可能であった。

(3) FFV による心筋リプログラミング改善の分子メカニズム

次に化合物による心筋リプログラミング改善の分子メカニズムを解析した。1. 血清入り培地群、2. 無血清培地群、3. 無血清培地/FFV 添加群の3群にわけて遺伝子の発現変化をマイクロアレイで解析した。また細胞拍動開始前後の 2,4 週で遺伝子発現を比較し、その間で変化する遺伝子群を GO term 解析や Pathway 解析で評価した。その結果、FFV 添加群心筋細胞の生理機能に参与する遺伝子群が上昇していた(図 6)。また FFV による細胞内シグナル伝達経路を調べたところ、PI3K/Akt と p38MAPK を介して複数の心筋リプログラミング遺伝子の発現が上昇して心筋リプログラミングを促進することがわかった。



(図 6)FFV で変化する遺伝子群
FFV により心筋関連遺伝子が上昇

考察と今後の課題

以上より世界に先駆けて、心筋リプログラミング効率の改善とリプログラミングの分子機構解明に成功した(Muraoka et al., EMBO J,2014)(Yamakawa et al, Stem Cell Reports,2015) (図 7 表紙に掲載)。今後の課題としては心筋直接リプログラミングによる心臓再生を臨床応用していくために、安全なベクターの開発、大動物を用いた前臨床研究などを行う必要がある。

(図 7) Stem Cell Reports 誌の表紙に掲載



Banyu Foundation Research Grant 2013—生活習慣病領域—
研究成果報告書(追加助成) <発表実績/予定一覧>

所 属	学校法人慶應義塾大学
氏 名	家田 真樹

1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> ・ 掲載年次順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。 ・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。 ・ 国内外雑誌を問わない。 ・ 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 	
① <論文 PDF 添付あり>	
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, <u>Ieda M.</u> Fibroblast Growth Factors and Vascular Endothelial Growth Factor Promote Cardiac Reprogramming under Defined Conditions. <i>Stem Cell Reports</i> . 5(6):1128-42, 2015. 査読有
2	Sadahiro T, Yamanaka S, <u>Ieda M.</u> Direct Cardiac Reprogramming: Progress and Challenges in Basic Biology and Clinical Applications. <i>Circ Res</i> . 116(8):1378-1391, 2015. 査読有
3	Muraoka N, <u>Ieda M.</u> Stoichiometry of transcription factors is critical for cardiac reprogramming. <i>Circ Res</i> . 116(2):216-8,2015. 査読有
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, <u>Ieda M.</u> MiR-133 promotes cardiac reprogramming by directly repressing Snai1 and silencing fibroblast signatures. <i>EMBO J</i> . 17;33(14):1565-81, 2014. 査読有
5	Muraoka N, <u>Ieda M.</u> Direct Reprogramming of Fibroblasts into Myocytes to Reverse Fibrosis. <i>Annu Rev Physiol</i> . 76:21-37, 2014. 査読有
② <論文 PDF 添付なし>	
1	Tamura Y, Sano M, Nakamura H, Ito K, Sato Y, Shinmura K, <u>Ieda M.</u> Fujita J, Kurosawa H, Ogawa S, Nakano S, Matsuzaki M, Fukuda K. Neural crest-derived resident cardiac cells contribute to the restoration of adrenergic function of transplanted heart in rodent. <i>Cardiovasc Res</i> . 2015 Dec 8. 査読有
2	Yamakawa H, <u>Ieda M.</u> Strategies for Heart Regeneration. <i>International Heart Journal</i> 56(1): 1-5, 2015. 査読有
3	Miyamoto K, <u>Ieda M.</u> Direct Reprogramming into Cardiomyocytes. <i>Inflammation and Regeneration</i> 34(5): 217-223, 2014. 査読有

4	Shirakawa K, Egashira T, Ieda M , Kawaguchi S, Okamoto K, Kudo M, Yokoyama K, Tsuruta H, Murata M, Mikami S, Anzai A, Hayashida K, Kohno T, Maekawa Y, Sano M, Yozu R, Fukuda K. Multidisciplinary approach to the treatment of cardiac AA amyloidosis and aortic stenosis due to Castleman's disease: a hybrid therapy with tocilizumab and aortic valve replacement. <i>Int J Cardiol.</i> May 1;173(2):e9-e11, 2014. 査読有
5	Katsumata Y, Shinmura K, Sugiura Y, Tohyama S, Matsushashi T, Ito H, Yan X, Ito K, Yuasa S, Ieda M , Urade Y, Suematsu M, Fukuda K, Sano M. Endogenous prostaglandin D2 and its metabolites protect the heart against ischemia-reperfusion injury by activating Nrf2. <i>Hypertension.</i> 63(1):80-7, 2014. 査読有

様式 4-3②

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ・ アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。 ・ 国内外を問わない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題 (国際学会、海外招待講演のみ記載)
1	2015.10.23-24	9th International Cell Therapy Conference <u>Masaki Ieda</u> “Direct Cardiac Reprogramming for Heart Repair” Seoul, South Korea
2	2015.7.13-16	American Heart Association Basic Cardiovascular Sciences 2015, Plenary session, <u>Masaki Ieda</u> “Reprogramming of Cardiac fibroblasts”, New Orleans, LA, USA.
3	2014.10.6-8.	CURRENT TRENDS IN BIOMEDICINE 2014, <u>Masaki Ieda</u> “Reprogramming Fibroblasts into Cardiomyocytes for Heart Repair”, Cardiovascular extracellular matrix in health and disease, Sede Antonio Machado, Baeza, Spain
4	2014.7.14-17.	American Heart Association Basic Cardiovascular Sciences 2014, Plenary session, <u>Masaki Ieda</u> “Discovery, Progress, and Challenges of Direct Cardiac Reprogramming for Heart Repair”, Las Vegas, Nevada, USA
5	2014.6.15-17.	THE UEHARA MEMORIAL FOUNDATION SYMPOSIUM 2014, Innovative Medicine: Basic Research and Development <u>Masaki Ieda</u> “Generation of Cardiomyocytes from fibroblasts by direct reprogramming technology”, Tokyo
6	2014.1.18	19th Medical Research Conference, Plenary lecture, <u>Masaki Ieda</u> “Bypassing Pluripotency”, The University of Hong Kong, Hong Kong, China
7	2013.11.16-20	American Heart Association Scientific Sessions 2013, The Best of Circulation Research Symposium, <u>Masaki Ieda</u> “Induction of Cardiomyocyte-like Cells in Infarct Hearts”, Dallas, USA
8	2013. 11.15.	New Jersey Medical School Seminar, <u>Masaki Ieda</u> “Discovery, Progress, and Challenges of Direct Cardiac Reprogramming for Heart Regeneration” Newark, NJ, USA
9	2013.7.25	Gladstone Institute Seminar, <u>Masaki Ieda</u> “Progress and Perspective of Direct Cardiac Reprogramming” San Francisco, California, USA

10	2013.7.22-24	American Heart Association Basic Cardiovascular Sciences 2013, <u>Masaki Ieda</u> , “Induction of Cardiomyocyte-like Cells by Defined Factors”, Las Vegas, Nevada, USA
11	2013.6.29-30	International Society for Heart Research (ISHR) Symposium, <u>Masaki Ieda</u> “Direct Cardiac Reprogramming by Defined Factors”, San Diego, USA
3. 投稿、発表予定 (投稿中の論文も含める)		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1		
2		
3		
4		