

Title	心筋直接リプログラミングを促進する化合物の同定
Sub Title	Cardiac reprogramming and chemical compounds
Author	家田, 真樹(Ieda, Masaki)
Publisher	
Publication year	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>これまでの心筋リプログラミング効率は低く、また血清入りの培養液を使用するため安全面の課題があった。そこで本研究では無血清培養下で拍動心筋の誘導を促進する化合物を同定し、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した。研究の結果、マウス線維芽細胞から心筋誘導遺伝子を導入後、FGF2/FGF10/VEGFを添加した無血清培地で培養をすると、通常の血清培地と比較して約40倍心筋誘導が改善した。またFGF2/FGF10/VEGF 添加により、2つの転写制御因子(Mef2c, Tbx5)のみで心筋誘導することが可能になった。</p> <p>Fibroblasts can be directly reprogrammed into cardiomyocyte-like cells (iCMs) by overexpression of cardiac transcription factors, including Gata4, Mef2c, and Tbx5 ; however, this process is inefficient under serum-based culture conditions. Here, we found that a combination of fibroblast growth factor (FGF) 2, FGF10, and vascular endothelial growth factor (VEGF), termed FFV, promoted cardiac reprogramming under defined serum-free conditions, increasing spontaneously beating iCMs by 40-fold compared with those under conventional serum-based conditions. Mechanistically, FFV activated multiple cardiac transcriptional regulators and converted partially reprogrammed cells into functional iCMs through the p38 mitogen-activated protein kinase and phosphoinositol 3-kinase/AKT pathways. Moreover, FFV enabled cardiac reprogramming with only Mef2c and Tbx5 through the induction of cardiac reprogramming factors, including Gata4.</p>
Notes	<p>研究種目：挑戦的萌芽研究 研究期間：2015～2017 課題番号：15K15313 研究分野：循環器内科</p>
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K15313seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15313

研究課題名(和文)心筋直接リプログラミングを促進する化合物の同定

研究課題名(英文)Cardiac reprogramming and chemical compounds

研究代表者

家田 真樹 (Ieda, Masaki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：70296557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの心筋リプログラミング効率は低く、また血清入りの培養液を使用するため安全面の課題があった。そこで本研究では無血清培養下で拍動心筋の誘導を促進する化合物を同定し、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した。研究の結果、マウス線維芽細胞から心筋誘導遺伝子を導入後、FGF2/FGF10/VEGFを添加した無血清培地で培養をすると、通常の血清培地と比較して約40倍心筋誘導が改善した。またFGF2/FGF10/VEGF添加により、2つの転写制御因子(Mef2c、Tbx5)のみで心筋誘導することが可能になった。

研究成果の概要(英文)：Fibroblasts can be directly reprogrammed into cardiomyocyte-like cells (iCMs) by overexpression of cardiac transcription factors, including Gata4, Mef2c, and Tbx5; however, this process is inefficient under serum-based culture conditions. Here, we found that a combination of fibroblast growth factor (FGF) 2, FGF10, and vascular endothelial growth factor (VEGF), termed FFV, promoted cardiac reprogramming under defined serum-free conditions, increasing spontaneously beating iCMs by 40-fold compared with those under conventional serum-based conditions. Mechanistically, FFV activated multiple cardiac transcriptional regulators and converted partially reprogrammed cells into functional iCMs through the p38 mitogen-activated protein kinase and phosphoinositol 3-kinase/AKT pathways. Moreover, FFV enabled cardiac reprogramming with only Mef2c and Tbx5 through the induction of cardiac reprogramming factors, including Gata4.

研究分野：循環器内科

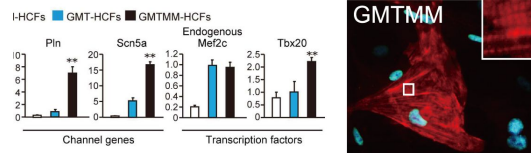
キーワード：再生

1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患を代表とする様々な心臓疾患に起因する心機能障害に対してこれまで様々な治療法が開発されているが、依然として心不全は本邦における重大な死因である。心臓はもっとも再生困難な臓器であり、心筋細胞は終末分化細胞で再生できないため、心臓障害後は線維芽細胞の増殖と線維化により心機能が低下する (Ieda et al, Dev Cell, 2009)。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、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞: induced pluripotent stem cells) 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。

2006 年、マウスの体細胞に山中 4 因子 (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) を導入し ES 細胞と同等な iPS 細胞を作製できること、2007 年にはヒト細胞からも iPS 細胞を作製できることが報告された (Takahashi et al, Cell 2006, Takahashi et al, Cell 2007)。血清を用いた浮遊培養法により心筋を作製する旧来の心筋誘導法では ES、iPS 細胞からの心筋分化効率は 5% 以下であったが、この数年間の研究で心筋誘導法は顕著に改善している。ES、iPS 細胞から心筋細胞への分化法は、基本的には心臓発生過程で重要となってくる TGF-beta family member である activin、BMP や Wnt、FGF、VEGF のシグナル伝達経路を増強あるいは抑制することで心筋誘導が改善し、無血清で上記の心筋誘導化合物を時期特異的に加えることで数 10% まで心筋誘導効率が改善した。一方、幹細胞使用に伴う腫瘍形成の可能性、移植細胞の長期生着、周囲心筋との電気的結合などの問題は依然克服すべき課題として残っている。

我々は、心臓内に存在する心臓線維芽細胞を生体内において直接心筋細胞へ分化誘導できればこれらの課題を解決することが可能と考え研究を開始した。これまでに心筋特異的な 3 つの転写因子 (Gata4, Mef2c, Tbx5) を線維芽細胞に導入して心筋への直接リプログラミングに *in vitro*, *in vivo* で成功した (Ieda et al, Cell 2010, Inagawa et al, Circ Res, 2012)。また 2 つの遺伝子 (Mesp1, Myocd) を 3 因子に加えるとヒト心筋誘導が可能であること、さらに miR-133 を追加するとヒト細胞で心筋蛋白誘導が 10 倍増加することを報告した (Wada et al, PNAS 2013, Muraoka et al, EMBO J 2014) (図 1)。しかしこれまでの研究では心筋リプログラミングで誘導される拍動心筋の効率は低く、また血清入りの培養液を使用するため安全面の課題があった。またこれまで心筋誘導化合物など液性因子の影響を検討した報告はない。そこで本研究では無血清培養下で拍動心筋の誘導を促進する化合物を同定し、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) ヒト誘導心筋細胞

2. 研究の目的

心臓は再生能力を持たない臓器であり、心臓病の次世代の治療として幹細胞から作製した心筋細胞移植など心臓再生医療が期待されている。一方、我々は新しい心臓再生法開発を目的として、これまでに心筋特異的な転写因子を導入して線維芽細胞から iPS 細胞を介さず心筋を直接誘導 (直接リプログラミング) することに成功した (Ieda et al, Cell 2010, Inagawa et al, Circ Res 2012, Wada et al, PNAS 2013, Muraoka et al, EMBO J 2014)。しかし血清入りの培養液使用による安全面での課題や、機能的に成熟した拍動する心筋細胞の誘導効率が低いなど効率面を改善する必要があった。そこで本研究では、無血清培養下で様々な化合物をスクリーニングし、拍動心筋を安全に効率よく作製できる心筋誘導化合物を同定する。さらにその化合物による心筋誘導促進の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 心筋誘導を促進する化合物のスクリーニングと心筋誘導化合物の同定

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、iPS 細胞作製において高い効果を示した小分子化合物をスクリーニングする。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する。

(2) 心筋誘導化合物が心筋リプログラミングを促進する投与期間の決定

次に化合物が心筋リプログラミング過程のどの時期に作用して心筋誘導を促進するか検討する。具体的にはマウス線維芽細胞に GMT を遺伝子導入後、血清入りと無血清/化合物入りの 2 種類の細胞培養液をさまざまな期間使用する。

(3) 心筋誘導化合物によるリプログラミング改善のメカニズム解析

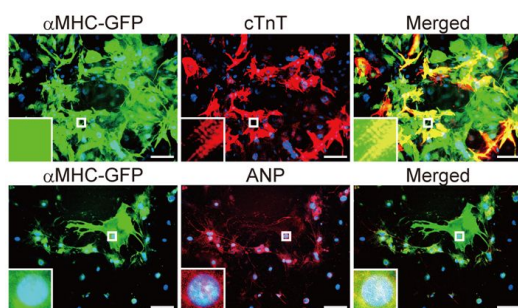
次に化合物による心筋リプログラミング改善の分子メカニズムを解析する。1. 血清入り培地群、2. 無血清培地群、3. 無血清培地/化合物添加群の 3 群にわけて遺伝子の発現変化をマイクロアレイで解析する。また細胞拍動開始前後の 2, 4 週で遺伝子発現を比較し、その間で変化する遺伝子群を GO term 解析や

Pathway 解析で評価する。

(4) 化合物を用いて心筋誘導転写因子を減らせるか検討する
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。化合物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する。

4. 研究成果

(1) FGF2, FGF10, VEGF は心筋誘導を促進する
我々は、セルソースを胎児培養線維芽細胞（以降、MEF (mouse embryonic fibroblasts) と略す）として、ES/iPS 細胞から心筋分化に使用する 8 つの小分子やサイトカインを無血清培地（以降、SF (serum free) 培地と略す）に添加したものを培養し、拍動を有する iCM 細胞を数えた。また、対照として DMEM/M199/10%胎児のウシ血清（以降、FBS (fetal bovine serum) 培地と略す）で培養した。スクリーニングの結果から、SF 培地に FGF2, FGF10, VEGF を各々加え培養すると、拍動する iCM 細胞が優位に増加した。さらに FGF2, FGF10, VEGF を全て加える (FFV 培地) と、40 倍の拍動する iCM 細胞を得ることができた。実際に FFV で培養した iCM 細胞も Ca²⁺トランジェントを認めており、免疫染色にて明瞭なサルコメア構造を持つ心筋特異的タンパクも確認できた (図 2)。



(図 2) 心筋誘導化合物投与下の誘導心筋心筋蛋白 cTnT, ANP, MHC-GFP を発現。

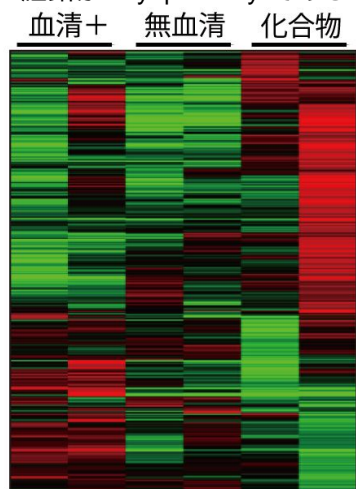
(2) FGF2, FGF10, VEGF は p38MAPK と PI3K/AKT 経路を通して心筋誘導を促進する
通常、GMT を遺伝子導入すると、機能的な iCM 細胞は 4 週間で発現する。その期間で、拍動を有する iCMs 細胞を誘導する際、FFV 培地に与える最適な培養条件を検討した。遺伝子導入後初めの 2 週間は FBS で、3 週目から FFV 培養すると効率的な拍動 iCM 細胞を得ることができた。時系列で見ると心筋前駆細胞マーカーである Mesp1 や Isl1 などの転写因子の変化はせず、また Edu アッセイでも FFV 培養でも自己増殖しないことを示された。心臓ペースメーカーの遺伝子である HCN4 の発現を認めなかった。結果として、ダイレクトリプログラミングの過程において、未熟な iCM が

FFV 培地によりフル・リプログラミングが推進し、拍動を有する iCM 細胞が増加すると考えられた。

FFV 培養により iCM 細胞が拍動を有するフル・リプログラミングを誘導するメカニズムを探索した。まず、マイクロアレイ解析により FFV で培養される iCM 細胞の遺伝子発現を、GMT 遺伝子導入後、2 週後 (拍動する前の iCM 細胞: 前期リプログラミング) と 4 週後 (拍動が認められる iCM 細胞後期リプログラミング) で網羅的に遺伝子発現を検討した。

4 週間 FFV で培養した iCM 細胞で、up-regulate した遺伝子を GO term 解析した結果、心筋収縮に関連する遺伝子群だけでなく、イオンチャネルやカルシウム・ホメオスタシスを調整する遺伝子群などの心筋機能を向上させる遺伝子群が増加していた。実際に、FFV で培養した iCM 細胞の遺伝子発現を検討すると、転写制御因子 (Gata6, Hand2, Nkx2-5)、心筋サルコメア関連遺伝子 (Actn2, Myh6 など)、そしてイオンチャネル遺伝子 (Kcnq1, Ryr2 など) を増加した。よって FFV により iCM 細胞の機能を亢進させていることが分かった (図 3)。

FGF と VEGF で活性化する経路としては、MEK, p38MAPK, PI3K/AKT 経路がある。FFV 培養に SB203580 (p38MAPK 阻害剤) と LY294002 (PI3K 阻害剤) を加えることで、拍動する iCM 細胞を抑制し、心筋関連遺伝子の発現を抑制した。よって、iCM 細胞誘導で p38MAPK と PI3K/AKT 経路が key pathway であると考えられた。



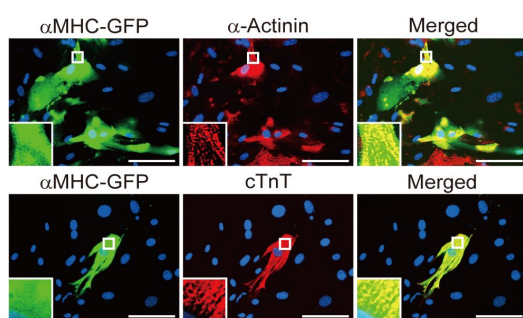
(図 3) 化合物による遺伝子発現変化をマイクロアレイで解析

(3) FFV は、Mef2c と Tbx5 のみで線維芽細胞から心筋リプログラミングを可能にする
今までは機能的な iCM 細胞を得るためには少なくとも GMT 3 つの転写因子が必要と考えられていたが、FFV 培養下では転写因子を減らすことが可能ではないかと考えた。

結果として、FFV 培養では、Gata4 をなくした、Mef2c と Tbx5 (以降、MT と略す) の 2 因子でも拍動を有する iCM 細胞を得ること

を見出した(以降、MT-iCM細胞と略す)。FFV培養したMT-iCM細胞は、Ca²⁺トランジェントも確認でき、心筋特異的タンパクも確認できた。実際にFFV培養したMT-iCM細胞と、FBS培養を比較すると、Gata4だけではなく、Hand2、Nkx2-5も含む心臓特異的転写因子がup-regulateしていることが分かった。

MT-iCM細胞のマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現を検討すると、GMTから誘導したiCM細胞(GMT-iCM細胞)に近い遺伝子発現パターンであった。また、心筋特異的遺伝子のみをup-regulateしており、骨格筋や平滑筋細胞を誘導することはなかった。よって、FFV培養したMT-iCM細胞は、Gata4を含む心筋特異的遺伝子をupregulateさせ、Mef2c、Tbx5の2つの転写因子だけで心臓リプログラミングすることを可能にすると考えられた(図4)。



(図4)化合物によりMef2c/Tbx5のみで心筋誘導

(4) FFVは、マウス尾部線維芽細胞も心臓リプログラミングを可能にする。GMTにHand2を加え遺伝子導入し、3週からFFVで培養すると最大9%の機能を有するiCM細胞を得ることができた(以降、GHMT-iCM細胞と略す)。さらに、GHMT-iCM細胞は心筋細胞シートのように収縮するようになることもあった。この結果は、GMTだけではなく、FFV培養は3週以降の後半のリプログラミングを促進していると考えられた。

MEFの心筋前駆細胞(CPC: Cardiac Progenitor Cell)混入を完全になくすために、マウス尾部線維芽細胞(tail-tip fibroblast)をセルソースとして実験を行った。心臓リプログラミング因子としては、GMT、GMTにHandを加えた(GHMT)ものや、GMTにMesp1とMyocd(GMTMM)を加えたもの(以降、GMTMM-iCM細胞と略す)で、フル・リプログラミングを有する拍動iCM細胞の誘導を検討した。

全ての心臓リプログラミング因子において、FFV培養では拍動するiCM細胞を多く得ることが出来た。FFV培養でのGMTMM-iCM細胞を網羅的な遺伝子解析の結果、心臓機能や心臓発生に必要な遺伝子群をup-regulateしていた。実際に、遺伝子発現を個別に確認すると、Gata6、Hand2、Nkx2-5を含む心臓関連遺伝子をup-regulateしていた。

よって、FFV培養は、セルソースにも関係なく、また心臓リプログラミング因子にも関係なく、拍動を有するiCM細胞を誘導できると考えられた。

(5) 得られた成果のインパクト、展望

本研究で化合物を用いることで、Mef2c、Tbx5の2因子のみで拍動するiCM細胞を得ることが出来た。p38MAPKとPI3K/AKT経路、未知の経路を介して、FFVがGata4と他の心臓リプログラミング因子の誘導を通してMef2cとTbx5だけで心臓リプログラミングすることを可能にするメカニズムも明らかにし、論文発表した。2因子で心臓リプログラミングができたのは世界で初めての成果である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)すべて査読あり

- (1) **Ieda M** (corresponding author). Heart Development, Diseases, and Regeneration - New Approaches From Innervation, Fibroblasts, and Reprogramming. *Circ J.* 80(10):2081-8. 2016
- (2) 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** (corresponding author). Fibroblast Growth Factors and Vascular Endothelial Growth Factor Promote Cardiac Reprogramming under Defined Conditions. *Stem Cell Reports.* 5(6):1128-42, 2015.
- (3) Sadahiro T, Yamanaka S, **Ieda M** (corresponding author). Direct Cardiac Reprogramming: Progress and Challenges in Basic Biology and Clinical Applications. *Circ Res.* 116(8):1378-1391, 2015.
- (4) Muraoka N, **Ieda M** (corresponding author). Stoichiometry of transcription factors is critical for cardiac reprogramming. *Circ Res.* 116(2):216-8, 2015.
- (5) Yamakawa H, **Ieda M** (corresponding author). Strategies for Heart Regeneration. *International Heart Journal* 56(1): 1-5, 2015.

[学会発表](計51件)

- (1) **Masaki Ieda**: Induced Pluripotent Stem Cells and Direct Cardiac Reprogramming - Solving Barriers for a Powerful Future: The 2016 New Experimental and Clinical Information,

American College of Cardiology: New York Cardiovascular Symposium, New York, USA, 2016.

- (2) **Masaki Ieda**: Direct Cardiac Reprogramming and Heart Regeneration, Japan-Spain Joint Workshop on Nanomedicine Research, Madrid, Spain, 2016.
- (3) **Masaki Ieda**: Novel Insights into Cardiac Development, Molecular Mechanisms of Cardiac Reprogramming, American Heart Association Scientific Sessions 2016, New Orleans, USA, 2016.
- (4) **Masaki Ieda**: Direct Cardiac Reprogramming, Regeneration, and Cell Fate Decision, Toward the Application of Human Biology Basic Researches, Tsukuba Global Science Week (TGSW) 2016, Tsukuba, Japan, 2016.
- (5) **Masaki Ieda**: Making New Cardiomyocytes by Direct Reprogramming, The 5th Gwangju-Boston Joint Cardiology Symposium, Gwangju, South Korea, 2016.

〔図書〕(計 14 件)

- (1)九石優樹、**家田真樹**：再生医療 ダイレクトリプログラミング、最新冠動脈疾患学（下巻）、日本臨床社、Vol. 74, p183-187, 2016.
- (2)田村文弥、**家田真樹**：心筋ダイレクトリプログラミングを用いた再生治療、20年後を見据えた心不全診療のあり方 基礎・臨床研究からの提言と臨床での実践、循環器専門医、Vol. 24, No. 2, p211-217, 2016.
- (3) 貞廣威太郎、**家田真樹**：心臓再生治療の現状と展望 心筋リプログラミングによる心臓再生、心臓、Vol. 48, No.12, p1351-1356, 2016.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

- (1)
名称：心筋様細胞の作製方法及びそれに用いる心筋様細胞の作製用組成物

発明者：井上 誠、弘中 孝史、宮本和享、**家田真樹**
権利者：慶応大学
種類：PCT
番号：PCT/JP2015/077664
出願年月日：2015 年 9 月 30 日
国内外の別：国外

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

報道・マスコミ

- (1) 読売新聞 iPS の 10 年 生命科学を変える 2. 『細胞の直接変化 再注目』2016 年 10 月 28 日
- (2) Jitsugaku Keio University “Mending broken hearts” 2016.8
- (3) BioMed サーカス.com 「執筆者自身による研究論文レビュー」 線維芽細胞増殖因子と血管内皮細胞増殖因子により心筋直接誘導を促進する 2016 年 2 月
- (4) 日経プレスリリース 『慶大、細胞増殖因子を用いた効率的な心筋様細胞の直接作製法を開発』 2015 年 11 月
- (5) 中公新書 『iPS 細胞 不可能を可能にした細胞』p232-233, 2015 年 4 月
- (6) 美巧社 『日本のトップレベル 研究者に聞く』p15-23, 2015 年 4 月

6. 研究組織

(1)研究代表者

家田 真樹 (IEDA, Masaki)
慶應義塾大学・医学部・専任講師
研究者番号：70296557