慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	マイクロRNAによる心筋リプログラミングと分子基盤の解明
Sub Title	Cardiac reprogramming and miRNA
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	我々はこれまでに心筋リプログラミング遺伝子を導入することで直接心筋作製可能であることを示してきた。しかしリプログラミングの分子機構は不明であり, また転写因子のみによる心筋の誘導効率は十分でないなどの課題もある。我々は本研究で心筋マイクロRNAであるmiR-133が心筋リプログラミングをマウスおよびヒト細胞で促進すること, さらにその分子メカニズムとしてmiR-133がSnai1を直接抑制して線維芽細胞の形質を抑制し心筋誘導することを見出した。本研究は世界で初めて心筋リプログラミングの分子基盤の一端を明らかにした論文である。 Here we found that addition of miR-133a (miR-133) to Gata4, Mef2c, and Tbx5 (GMT) or GMT plus Mesp1 and Myocd improved cardiac reprogramming from mouse or human fibroblasts by directly repressing Snai1, a master regulator of epithelial-to-mesenchymal transition. MiR-133 overexpression with GMT generated 7-fold more beating iCMs from mouse embryonic fibroblasts, and shortened the duration to induce beating cells from 30 to 10 days, compared to GMT alone. Snai1 knockdown suppressed fibroblast genes, upregulated cardiac gene expression, and induced more contracting iCMs with GMT transduction, recapitulating the effects of miR-133 overexpression. In contrast, overexpression of Snai1 in GMT/miR-133-transduced cells maintained fibroblast signatures and inhibited generation of beating iCMs. MiR-133-mediated Snai1 repression was also critical for cardiac reprogramming in adult mouse and human cardiac fibroblasts.
Notes	研究種目 : 基盤研究(B)(一般) 研究期間 : 2014 ~ 2017 課題番号 : 26293193 研究分野 : 循環器内科
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_26293193seika

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.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　３０　年　　６　月　２２　日現在

機関番号：　３２６１２
研究種目：　基盤研究(B)（一般）
研究期間：　2014～2017
課題番号：　２６２９３１９３

研究課題名（和文）マイクロRNAによる心筋リプログラミングと分子基盤の解明

研究課題名（英文）Cardiac reprogramming and miRNA

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）　　12,700,000円

研究成果の概要（和文）：我々はこれまでに心筋リプログラミング遺伝子を導入することで直接心筋作製可能であることを示してきた。しかしリプログラミングの分子機構は不明であり、また転写因子のみによる心筋の誘導効率は十分でないなどの課題もある。我々は本研究で心筋マイクロRNAであるmiR-133が心筋リプログラミングをマウスおよびヒト細胞で促進すること、さらにその分子メカニズムとしてmiR-133がSnai1を直接抑制して線維芽細胞の形質を抑制し心筋誘導することを見出した。本研究は世界で初めて心筋リプログラミングの分子基盤の一端を明らかにした論文である。

研究成果の概要（英文）：Here we found that addition of miR-133a (miR-133) to Gata4, Mef2c, and Tbx5 (GMT) or GMT plus Mesp1 and Myocd improved cardiac reprogramming from mouse or human fibroblasts by directly repressing Snai1, a master regulator of epithelial-to-mesenchymal transition. MiR-133 overexpression with GMT generated 7-fold more beating iCMs from mouse embryonic fibroblasts, and shortened the duration to induce beating cells from 30 to 10 days, compared to GMT alone. Snai1 knockdown suppressed fibroblast genes, upregulated cardiac gene expression, and induced more contracting iCMs with GMT transduction, recapitulating the effects of miR-133 overexpression. In contrast, overexpression of Snai1 in GMT/miR-133-transduced cells maintained fibroblast signatures and inhibited generation of beating iCMs. MiR-133-mediated Snai1 repression was also critical for cardiac reprogramming in adult mouse and human cardiac fibroblasts.

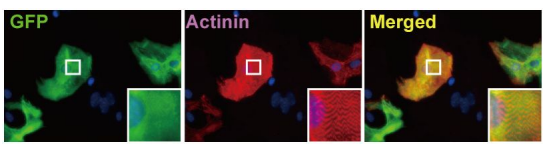
研究分野：　循環器内科

キーワード：　再生

１．研究開始当初の背景

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。これに対し我々は心臓再生に対する新しいアプローチとして、心臓内に多数存在する心臓線維芽細胞を生体内で直接心筋細胞へ分化転換する心筋直接リプログラミング研究を開始した。

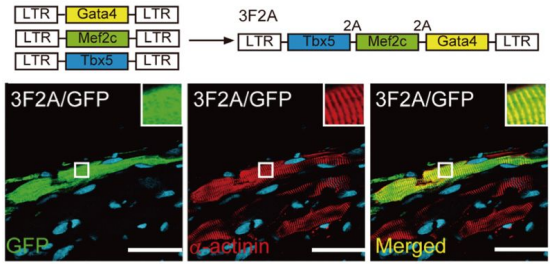
1987 年に骨格筋のマスター遺伝子 MyoD が発見されたが、体細胞を心筋に転換できる心筋マスター遺伝子はこれまで長らく発見されていなかった。そこで我々はまず遺伝子改変マウスを用いて心筋リプログラミング因子（心筋マスター遺伝子群）を探索する in vitro 実験から研究を開始した。最初に心筋細胞のみ GFP を発現するαMHC-GFP トランスジェニックマウスを作製して、そのマウス線維芽細胞からの心筋誘導効率を FACS で定量的に評価できるスクリーニングシステムを開発した。心臓発生に重要な 14 の因子を選び GFP 陰性の線維芽細胞にレトロウイルスで同時に導入したところ、1-2%の細胞が心筋遺伝子の活性化を意味するαMHC-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約 15-20%の心臓線維芽細胞がαMHC-GFP 陽性の心筋様細胞に転換することを見出した。αMHC-GFP 陽性の細胞はグローバルな遺伝子発現パターンも心筋と類似しており、誘導された心筋様細胞はエピジェネティックにも安定していた。また多くの細胞で心筋に特徴的な横紋構造と自発的な細胞内カルシウム濃度変化を認め、一部の細胞では自律的拍動と心室筋様の活動電位を認めた。以上より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(図 1)（Ieda et al, Cell 2010)。



(図 1)　マウス誘導心筋細胞

次に我々は心筋リプログラミング因子の導入により生体内で内在性心臓線維芽細胞を直接心筋細胞へリプログラミング（生体内心筋リプログラミング）することが可能か検討した。冠動脈を結紮しマウス急性心筋梗塞モデルを作製して、開胸下でレトロウイルスベクターにより遺伝子導入を行った。GFP ウイルスを同時に導入することによりウイルスベクターが感染した線維芽細胞を追跡することが可能となり心筋誘導を評価できる。陰性対照では線維芽細胞から心筋細胞への誘導はみられなかったが、3 つの心筋誘導遺伝子（GMT）のウイルス液を別々に作製して心筋梗塞部位に注射した群では、2 週間後に梗塞部の一部の線維芽細胞で心筋遺伝子が誘導された。

次に 3 つの遺伝子を一つのベクターから同時に発現できるポリシストロニックウイルスベクターを開発して心筋誘導の改善を試みた。このポリシストロニックベクターを心筋梗塞部に注射したところ、複数の心筋遺伝子の誘導が定量的 RT-PCR で確認された。また新生心筋細胞のうち 30%で横紋構造を確認でき、GMT を別々のベクターで導入した場合と比較して成熟心筋の誘導効率を 2 倍に改善することができた。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(図 2)(Inagawa et al, Circ Res, 2012)。

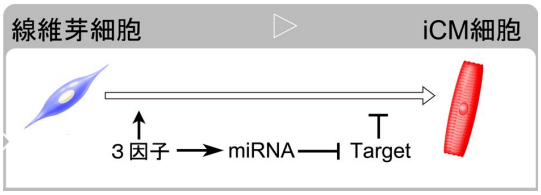


（図 2）生体内リプログラミングによる誘導心筋細胞

次に我々はヒト線維芽細胞から心筋直接誘導が可能か検討した。最初にマウス心筋リプログラミング因子 GMT のみではヒト心筋誘導に不十分であることを見出した。そこで GMT に新たに 11 種類の候補遺伝子を１つずつ加えるスクリーニングを行った。その結果、候補遺伝子中の Myocd あるいは Mesp１を GMT と同時に導入すると心筋特異的遺伝子（Tnnt2, Nppa, Ryr2）の発現が誘導されることを発見した。さらに、GMT に Myocd、Mesp１を加えた 5 遺伝子（GMTMM）を導入すると、心筋誘導が強まることを見いだした。GMTMM をヒト心臓線維芽細胞に導入すると、遺伝子発現様式は心筋様に変化し、細胞の形態も心筋に類似して内部に横紋筋構造も確認できた。さらにこの細胞は自発的な細胞内カルシウム濃度変化を認め、心筋細胞との共培養で周囲の心筋と協調して拍動した。以上より、Gata4, Mef2c, Tbx5, Mesp1, Myocd (GMTMM)の 5 遺伝子によりヒト細胞でも心筋リプログラミング可能であることを明らかにした（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、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る。そこで本研究では心筋誘導を促進するマイクロ RNA を同定し、さらに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する（図３）。



（図３）マイクロ RNA による心筋誘導

２．研究の目的

心臓は再生能力の乏しい臓器であり、重症心不全に対する新しい治療として再生医療が期待されている。心臓再生法には体外で細胞を作製して移植する方法があるが、複雑な行程を要し、細胞の長期生着などの課題がある。これに対し、我々はこれまでに複数の心筋転写因子を導入して心臓内在性の線維芽細胞から心筋を直接作製する心筋リプログラミング法を開発してきた。この方法は幹細胞を経由しないので腫瘍形成の可能性が低い、行程が単純で細胞移植の必要がないなど利点を有する。しかしリプログラミングの分子機構は不明であり、また転写因子のみによる心筋の誘導効率は十分でないなどの課題もある。そこで本研究では心筋リプログラミングを促進するマイクロ RNA を同定して、さらにリプログラミングの分子機構を解明することを目的とする。

３．研究の方法

(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、まずその候補因子として心筋特異的に発現するマイクロ RNA を同定する。方法としては自ら開発した心筋細胞と線維芽細胞の FACS による細胞選別法を用いて（Ieda et al, Dev Cell, 2009)、心筋特異的マイクロ RNA の発現をマイクロアレイ法で解析する。また誘導心筋における心筋特異的マイクロ RNA の発現レベルを qRT-PCR で確認する。

(2) 心筋直接リプログラミングを促進するマイクロ RNA の同定

新規のものも含めた 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 を同定する。スクリーニング方法としては MHC GFP マウスの心臓線維芽細胞に Gata4/Mef2c/Tbx5 の 3 因子を導入する際に、同時にマイクロ RNA 機能を増強するマイクロ 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する。

(3) マイクロ RNA により誘導される心筋様細胞の経時的変化

マイクロ RNA による心筋リプログラミング促進効果の分子基盤を明らかにするため、経時的に誘導心筋細胞の遺伝子発現や生理機能を解析する。方法としては□-MHC GFP マウスを用いて、このマウス線維芽細胞に Gata4, Mef2c, Tbx5 (GMT)あるいは GMT/miR-X を導入して経時的に GFP 陽性の誘導心筋細胞を FACS により精製収集する。誘導心筋細胞の心筋および線維芽細胞遺伝子の発現変化を qRT-PCR で、心筋特異的蛋白の発現や横紋構造を FACS や免疫染色で確認する。また生理機能は自発的に細胞内カルシウム濃度変化を有する細胞数や自律拍動する細胞数の変化を経時的に記録し解析する。

(4) マイクロ RNA による心筋リプログラミング促進制御機構

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-X 導入により発現が変化する遺伝子を網羅的に解析する。方法としては Gata4, Mef2c, Tbx5 (GMT)あるいは GMT/miR-X を 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する。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て、miR-X によりどのような性質をもった遺伝子群が上昇するか、または低下するかを明らかにする。さらに遺伝子導入後早い時期と遅い時期でも同様の解析を行い、結果を確認する。

(5) マイクロ RNA のターゲット分子同定と心筋リプログラミングの分子基盤解明

マイクロ RNA はシードシークエンスと配列が一致する遺伝子の 3’-UTR 領域に直接結合して、遺伝子の発現を抑制して機能する。そこで心筋リプログラミングの分子基盤を解明するため、miR-X の作用を説明できるターゲット遺伝子を同定する。方法としては miR-X 導入により発現が低下する遺伝子をマイクロアレイ法で探索して、候補遺伝子を TargetScan などの Bioinformatics で絞り込む。最終的に候補遺伝子の発現抑制をルシフェラーゼアッセイ、遺伝子発現や蛋白発現の低下を qRT-PCR や Western blot などで確認する。

(6) マイクロ RNA によるヒト心筋リプログラミング

上記マウス研究で同定した miR-X を自ら同定したヒト心筋リプログラミング因子(GMTMM)と一緒にヒト線維芽細胞に導入して、ヒト心筋誘導効果を解析する。具体的にはこ

れまでの研究で得た知見や材料を利用して、qRT-PCR、免疫染色、FACS、マイクロアレイや生理機能的検査（Ca イメージ、細胞拍動、パッチクランプ）でヒト心筋誘導効果を判定する（Wada et al, PNAS, 2013)。

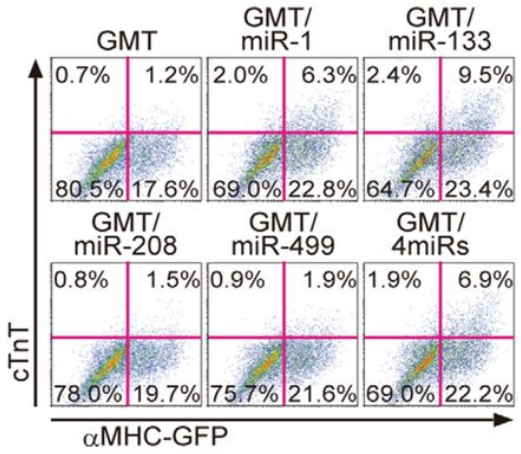
４．研究成果

(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。これらの miR は心筋に特異的に発現していることを qRT-PCR で確認した。

(2) miR-133 はマウス心筋リプログラミングを促進

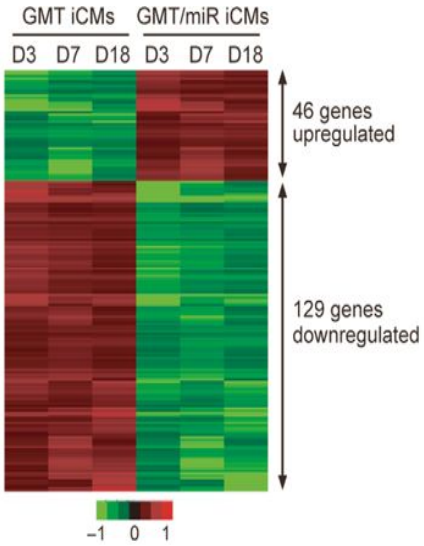
複数の心筋特異的マイクロ RNA の中から心筋リプログラミングを促進するマイクロ RNA を同定した MHC GFP マウス線維芽細胞に Gata4/Mef2c/Tbx5 の 3 因子を導入する際に、同時にマイクロ RNA mimic (miR)を導入して心筋誘導効果をαMHC-GFP、cardiac troponin T (cTnT)の心筋マーカーで FACS により定量的に解析した結果、miR-133 が心筋リプログラミングを 8 倍促進することを見出した（図４）。生理機能として自律拍動する細胞数は GMT 群と比較して 7 倍に増加し、さらに細胞拍動まで従来１か月かかったところをわずか 10 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４）心筋マイクロ RNA による心筋誘導促進。miR-133 によりαMHC-GFP+/cTnT+細胞が増加

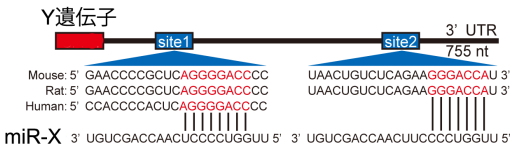
(3) miR-133 は Snai1 を直接抑制して線維芽細胞の形質を抑制する

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 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５)。



（図５） miR-133 により線維芽細胞関連遺伝子が低下

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６）。

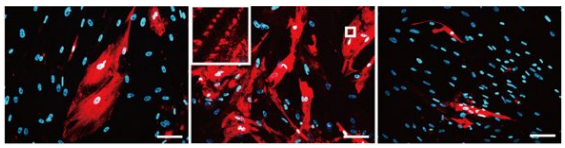


（図６） miR-133 は Snai1 をダイレクトに抑制

（４）マイクロ RNA 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７）。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。

（図７）miR-133 によるヒト心筋誘導
左は５因子(Gata4, Mef2c, Tbx5, Mesp1, Myocd)、中央は miR-133+5 因子、右は miR-133+5 因子＋Snai1



(5)　得られた成果のインパクト

以上より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、さらにその分子基盤を見出し、論文発表した。これまで心筋リプログラミングの分子基盤は不明であり、本論文は世界で初めてリプログラミング分子基盤の一端を明らかにする論文である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　12 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.

(6) 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** (corresponding author). MiR-133 promotes cardiac reprogramming by directly repressing Snai1 and silencing fibroblast signatures. EMBO J. 33(14):1565-81, 2014

〔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　24 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　2 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

(2)
名称：心筋様細胞の作製方法及びそれに用いる培地
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：特願
番号 特願 2014-096729
出願年月日：2014 年 5 月 8 日
国内外の別：国内

○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

(7) 読売新聞　再生医療で患者を救う　再生医療学会公開フォーラム 『新しい心筋作る別の手法を研究』 2014 年 10 月 27 日

(8) 日経メディカル特別編集版 - Unmet Medical Needs-『線維芽細胞を心筋細胞に分化』2014 年秋特集号　p19

(9) 毎日新聞、共同通信、時事通信、朝日新聞、読売新聞、日本経済新聞、日経産業新聞、日刊工業新聞、化学工業日報、佐賀新聞、静岡新聞、愛媛新聞、西日本新聞、マイナビニュースなど
『慶応大、iPS 細胞を用いない短期間かつ効率的な心筋細胞直接作製法を開発』
2014 年 6 月 12 日

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