

【目的】 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。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。心臓発生の過程で時期特異的な発現を示す遺伝子群を経時的に解析する。表面マーカーによる定量評価を行い、心臓中胚葉細胞の誘導効率を評価する。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) を作製した。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を行う。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：心筋誘導効率を改善する目的で、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 の柔らかさであるため、この環境を再現するために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* に加えて複数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る。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。我々は心筋誘導を促進する環境として、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。

柔らかい足場は心筋誘導を促進する

