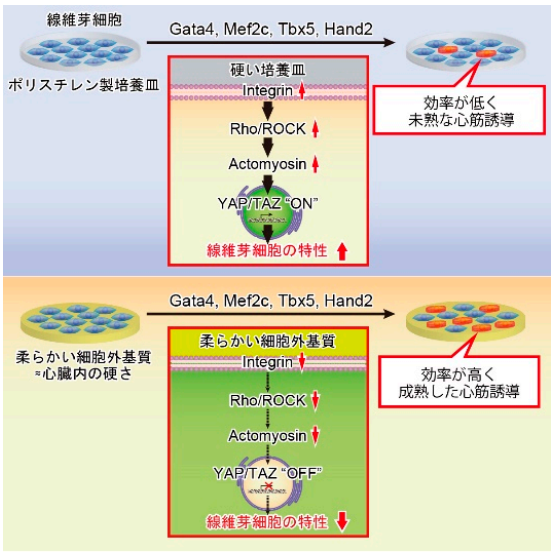
180　心臓幹細胞直接リプログラミングによる心臓再生の確立	貞廣　威太郎

【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。

柔らかな足場は心筋誘導を促進する



180. 心臓幹細胞直接リプログラミングによる心臓再生の確立

貞廣　威太郎

筑波大学 医学医療系 循環器内科

Key words：線維芽細胞，心筋再生，直接リプログラミング，心臓幹細胞

緒　言

重症心疾患では心筋細胞が壊死し、線維芽細胞に置換される。心機能が低下した心臓は、心不全に至る。心不全に対する新規治療法として期待される iPS 細胞を用いた再生医療は腫瘍形成の可能性、移植細胞の生着率などの課題がある。さらに置換された線維芽細胞の存在そのものが心不全の予後不良因子となることから、心筋を再生するとともに線維化に対する治療が必要となるが、現時点で有効な抗線維化治療は存在していない。心臓内在性の線維芽細胞を直接その場で心筋に転換できたらこれらの問題を解決することができる。我々は、心臓線維芽細胞に心筋特異的転写因子を導入し、iPS 細胞を介さずに心筋様細胞（iCM 細胞）を誘導する直接リプログラミングに成功した。以降も分子生物学的な機序を解明し、臨床応用に向けた心筋誘導効率の改善やマウス生体内における生体内心筋リプログラミングに成功した。しかし iCM 細胞は終末分化細胞で複製能がなく、心筋再生に必要な細胞数（心疾患では約 10 億個の心筋細胞が壊死する）が得られない可能性がある。一方、生体の心臓発生過程では自己複製能を有し、心臓内の全ての細胞に分化することが可能な心臓幹細胞が形成されている。線維芽細胞を心臓幹細胞に転換できれば、心疾患で失われた心筋細胞や血管内皮細胞を大量に得ることが可能になり、再生医療は飛躍的に発展する。これまで線維芽細胞から心臓幹細胞を誘導する因子は不明であったが、これに先駆けて我々は初期中胚葉で発現している *Tbx6* 遺伝子を多能性幹細胞に導入することにより、液性因子を使用せずに心臓幹細胞である心臓中胚葉細胞を作製し、そこから心筋細胞や血管内皮細胞を誘導する新たな心筋・血管細胞作製法を開発した。そこで本研究では、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幹細胞を直接作製する、心臓幹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）を作製する。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. 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した

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した検討では、線維芽細胞に *Tbx6* 遺伝子を導入すると、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。表面マーカーによる定量評価では 5%の誘導効率で心臓中胚葉細胞が誘導されていた。目的遺伝子の発現を自在に制御できるテトラサイクリン遺伝子発現調節システムを用いて、*Tbx6* 遺伝子の至適な発現期間や培養条件を検討したが心筋誘導を促進することは困難であった。

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）を用いて更なる検討を行った。GFP 陽性の心臓中胚葉／心血管系細胞を定量的に観察することで、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った。Tbx6 を遺伝子導入したマウス胎児線維芽細胞からは GFP 陽性のコロニー（心臓中胚葉）が形成されたことを確認した（図 1a）。さらに心筋誘導を促進するために、Tbx6 に加えて心臓特異的な遺伝子群を追加して線維芽細胞へ導入したところ、一過性の心臓中胚葉遺伝子の上昇の後に、心臓前駆細胞・心筋細胞遺伝子の上昇を認めた。一部の心筋細胞では GFP を発現しており、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（図 1b）。一方で、その誘導効率は低く、心筋誘導効率を促進する必要があった。

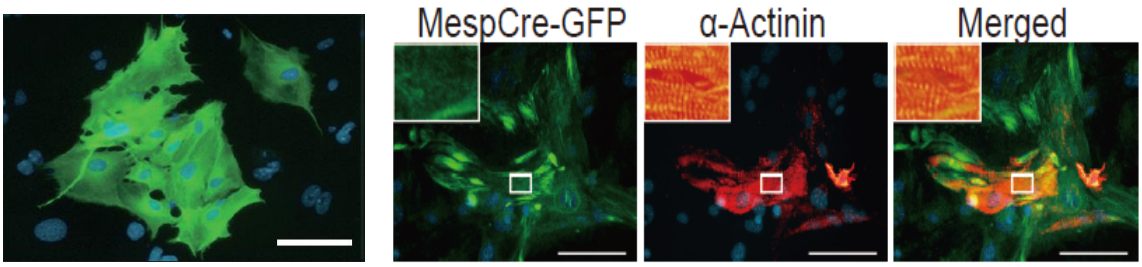


図 1. Tbx6 によって誘導された心臓中胚葉（a：左図）と心筋細胞（b：右図）

a）Tbx6 によって誘導された心臓中胚葉細胞のコロニー。

b）心臓中胚葉から分化したことを示す GFP 陽性の心筋細胞が誘導された。

スケールバー：100 μm。

2. 心筋誘導を促進する柔らかい足場の発見と、分子生物学的機序を解明した

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おり、生体内では心筋誘導が促進される可能性が示唆されていた［1〜3］。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、適切な足場の固さが心筋誘導を促進するのではと仮説をたてた。この生体内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。

既に方法が確立した iCM 細胞を用いた実験の結果では、心臓の硬さを模倣した柔らかい ECM（8 kPa）上では通常のポリスチレン製の硬い培養皿（1 GPa）での誘導と比べて、拍動する成熟した iCM 細胞の誘導効率が約 2.5 倍に上昇した。一方で、線維化組織を模倣した硬い ECM（126 kPa）上では、8 kPa と比べて誘導効率が約 50%も低下することが明らかとなり、生体内における心筋直接リプログラミングの促進と、線維化組織内での iCM 細胞誘導効率が低下する状況が再現された。8 kPa と 126 kPa の ECM 上で誘導した iCM 細胞の遺伝子発現変化をマイクロアレイで解析した結果、柔らかい ECM では心筋細胞関連の遺伝子が上昇し、線維芽細胞関連の遺伝子発現が低下していた。さらに細胞外基質からの情報伝達器官であるインテグリン経路と、その下流に存在する転写調節因子 YAP および TAZ 関連遺伝子が抑制されていることが明らかとなり、メカノトランスダクションによるインテグリンーYAP／TAZ シグナル経路の変化がリプログラミング効率に影響を及ぼすと考えられた。

ウエスタンブロットの解析により、ポリスチレン製培養皿・硬い ECM では iCM 細胞の YAP／TAZ が活性化されている一方で、柔らかい ECM 上では抑制されていることが明らかになった。そこで ECM の硬さが、インテグリン－YAP／TAZ シグナル経路を介して iCM 細胞の誘導効率を制御しているかを明らかにする目的で、硬い ECM（126 kPa）上で線維芽細胞の YAP／TAZ をそれぞれノックダウンさせたところ、iCM 細胞の誘導効率が改善された（図 2）。一方で、柔らかい 8 kPa の ECM 上で線維芽細胞に YAP／TAZ を過剰発現させたところ、誘導効率は有意に抑制された（図 3）。以上の結果から、硬い ECM 上で活性化される YAP／TAZ が心筋直接リプログラミングを阻害する機序であり、柔らかい ECM 上では YAP／TAZ が抑制されることで、iCM 細胞の誘導効率を促進させていることが明らかになった。

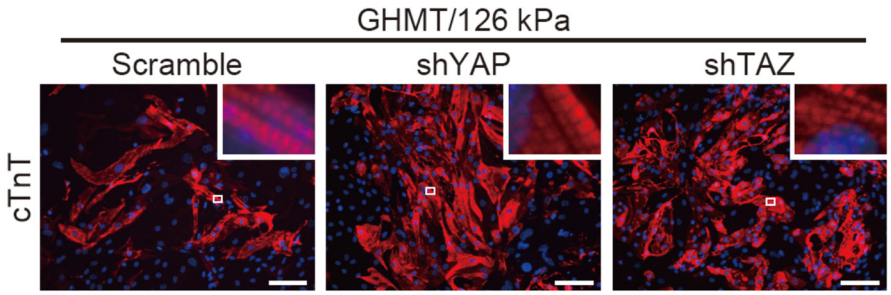


図 2. YAP、TAZ の抑制により、硬い足場での心筋誘導効率が改善した
shRNA による YAP／TAZ ノックダウンにより心筋細胞（赤色）の誘導効率が改善。硬い足場で活性化される YAP／TAZ を抑制することで、心筋リプログラミング効率が改善することが示された（スケールバー：100 μm）。

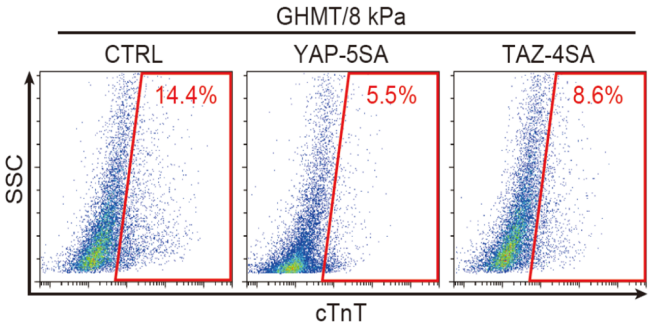


図 3. YAP、TAZ の過剰発現により、柔らかい足場での心筋誘導が阻害された
FACS によるトロポニン陽性細胞の定量評価。YAP／TAZ 過剰発現により、柔らかい足場上でのトロポニン陽性細胞の誘導効率は減少した。

3. インテグリン-YAP/TAZ シグナル経路を抑制する阻害剤を用いた新たな心筋直接リプログラミング法の開発と、詳細な分子生物学的機序の解明

上記の知見から、インテグリン-YAP／TAZ 経路を抑制することで、活性化した YAP／TAZ により心筋直接リプログラミングが阻害される硬い足場上でも、iCM 細胞の誘導効率が改善される可能性が示された。そこで、この経路を抑制する二つの阻害剤（ROCK 阻害剤、Myosin Ⅱ阻害剤）を培地に加えたところ、硬い ECM 上やポリスチレン製培養皿上での iCM 細胞の誘導効率は 2 倍に上昇した（図 4）。一方で、これらの阻害剤は既に YAP／TAZ が抑制されている柔らかい ECM 上では誘導効率を促進させることはなく、硬い足場によって活性化された YAP／TAZ を抑制して、iCM 細胞の誘導を促進していることが示された。今後は、この心筋誘導を促進する培養環境や、誘導を阻害する YAP／TAZ 経路の阻害剤を併用し、Tbx6 によって誘導した心臓中胚葉細胞から効果的な心筋誘導法を開発していく。

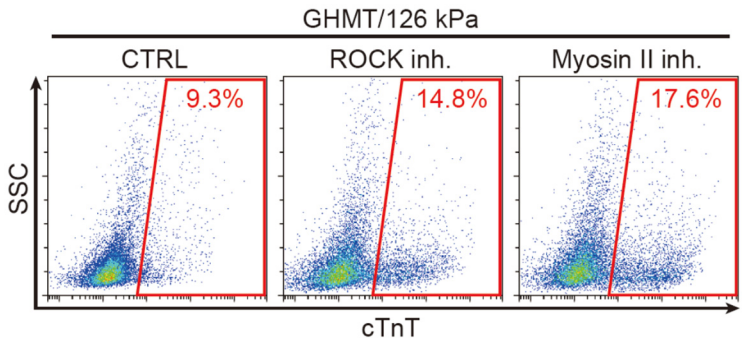


図 4. インテグリン-YAP／TAZ 経路阻害薬は硬い足場上での心筋誘導効率を改善する
FACS による定量評価では、インテグリンーYAP／TAZ 経路の阻害薬を培地に付加することで、硬い足場上でのトロポニン陽性細胞の誘導効率が上昇した。

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改良が必要であった。そこで、心筋誘導を促進する生体内環境に着目し、細胞周囲の足場のかたさによって誘導が制御されている可能性を見出した。iCM 細胞を用いた検討の結果、固い足場では YAP／TAZ 経路の活性化に伴い、線維芽細胞の性質が維持されており、これが心筋誘導を阻害する機序であることを明らかにした［4］。Tbx6 によって誘導した心臓中胚葉細胞も周囲の環境によって心筋誘導が阻害されている可能性が示唆されており、今後は培養環境への介入が必要だと考えられた。

文　献

1) Inagawa K, Miyamoto K, Yamakawa H, Muraoka N, Sadahiro T, Umei T, et al. Induction of cardiomyocyte-like cells in infarct hearts by gene transfer of Gata4, Mef2c, and Tbx5. Circulation research. 2012;111(9):1147-56. Epub 2012/08/31. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.271148. PubMed PMID: 22931955.

2) Miyamoto K, Akiyama M, Tamura F, Isomi M, Yamakawa H, Sadahiro T, et al. Direct In Vivo Reprogramming with Sendai Virus Vectors Improves Cardiac Function after Myocardial Infarction. Cell stem cell. 2018;22(1):91-103 e5. Epub 2017/12/26. doi: 10.1016/j.stem.2017.11.010. PubMed PMID: 29276141.

3) Sadahiro T, Yamanaka S, Ieda M. Direct cardiac reprogramming: progress and challenges in basic biology and clinical applications. Circulation research. 2015;116(8):1378-91. Epub 2015/04/11. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305374. PubMed PMID: 25858064.

4) Kurotsu S, Sadahiro T, Fujita R, Tani H, Yamakawa H, Tamura F, et al. Soft Matrix Promotes Cardiac Reprogramming via Inhibition of YAP/TAZ and Suppression of Fibroblast Signatures. Stem cell reports. 2020;15(3):612-28. Epub 2020/08/29. doi: 10.1016/j.stemcr.2020.07.022. PubMed PMID: 32857980; PubMed Central PMCID: PMC7486305.