

2022年12月12日

報道関係者各位

国立大学法人筑波大学
慶應義塾大学医学部

慢性心不全を心筋ダイレクトリプログラミングで改善 ～新しい心臓再生医療に向けて～

心臓を構成する心筋細胞は再生能力が乏しく、心機能が著しく低下した心不全の根治療法は、心臓移植しかありませんが、ドナー不足などの問題により、十分な治療の提供は困難です。また、iPS細胞などの多能性幹細胞を用いた再生医療が注目されていますが、これにも、腫瘍形成の可能性、組織生着率や治療効果の低さ、といった課題があります。

本研究グループは、これらの課題を解決し得る方法として、幹細胞を用いずに心臓線維芽細胞から直接心筋細胞を誘導する「心筋ダイレクトリプログラミング法」を開発し、急性心筋梗塞マウスの心臓再生に成功しています。しかしながらこれまで、有効な治療法のない心筋梗塞の慢性期にもこの方法が適用できるかは不明でした。そこで本研究では、まず、心筋リプログラミング遺伝子の発現を薬剤投与によって自由に制御できる新しい遺伝子改変マウスを開発し、心筋ダイレクトリプログラミングを行いました。その結果、心筋梗塞慢性期の線維芽細胞から心筋細胞が再生し、心機能が改善することを世界で初めて明らかにしました。さらに、線維化（組織が硬くなる）に関与する遺伝子を高発現する悪玉心臓線維芽細胞が、同遺伝子発現の低い善玉線維芽細胞に変化して、梗塞巣（心筋細胞が壊死した範囲）が退縮することも見出しました。

本研究により、心筋ダイレクトリプログラミングは、心臓線維芽細胞からの心筋再生と、線維芽細胞の善玉化を介した抗線維化作用の両面で、心筋梗塞慢性期の心不全を改善させることが明らかになりました。

研究代表者

筑波大学医学医療系

家田 真樹 教授

慶應義塾大学医学部内科学教室（循環器）

福田 恵一 教授

研究の背景

心臓を構成する心筋細胞は再生能力が乏しく、心筋梗塞などの心疾患により壊死すると、収縮力をもたない線維芽細胞や線維化組織に置換され、やがて心機能が低下して慢性心不全^{注1)}に至ります。これまでの心不全治療は、残された心筋細胞の肥大などを防ぐための投薬治療などに限られ、線維化した慢性期心筋梗塞巣を退縮させる治療はありませんでした。

心機能が著しく低下した重症心不全に対する根本的な治療法には心臓移植がありますが、ドナー不足の問題等があります。ES細胞やiPS細胞など多能性幹細胞から作製した心筋細胞を移植する心臓再生治療の開発も注目されていますが、このような心臓再生治療は、腫瘍形成の可能性、組織生着率の低さ、心臓線維化への治療効果が乏しい、等が課題になっています。本研究グループは、これらの課題を解決し得る方法として、幹細胞を用いずに心臓線維芽細胞から直接心筋細胞を誘導する「心筋ダイレクトリプログラミング法」を開発しています(家田ら、2021)。これまでに、心筋リプログラミング遺伝子^{注2)}を世界で初めて見だし、さらに同遺伝子を急性心筋梗塞モデルマウスの心臓内にウイルスベクターを用いて導入することで、心臓線維芽細胞が心筋細胞へ直接転換し、心機能が回復することを報告しています。

心臓再生医療開発を進める上で、心筋ダイレクトリプログラミング法が慢性心不全治療にも適用可能であるかを明らかにすることは非常に重要です。しかしながら、これまでの生体内での研究はすべて急性心筋梗塞を対象としており、心筋梗塞後慢性期については、モデルマウスを得るために、心筋梗塞作製とウイルスベクター投与など複数回の手術が必要となることから、検証が行われていません。そこで本研究では、生体内心臓線維芽細胞での心筋リプログラミング遺伝子発現を、薬剤投与によって自由に制御できる遺伝子改変マウスを開発し、これを用いて心筋梗塞後慢性期の心不全における、心筋ダイレクトリプログラミングの治療効果を調べました。

研究内容と成果

本研究ではまず、ホルモン剤の一つであるタモキシフェン投与によって、心臓線維芽細胞でのみ心筋リプログラミング遺伝子と赤色の蛍光蛋白が発現する遺伝子改変マウスを作製しました。これにより、心筋梗塞発症後の任意の時期に、ウイルスベクター投与手術をすることなく、薬剤投与で心筋ダイレクトリプログラミングが可能になり、さらに赤色で標識した線維芽細胞を追跡することができます。まず、同改変マウスの急性心筋梗塞モデルにおいて、タモキシフェンを投与したところ、心筋ダイレクトリプログラミングと心機能改善が確認されました。次に、心筋梗塞作製1か月後の慢性心不全状態である同改変マウスにタモキシフェンを投与して、心筋ダイレクトリプログラミングの効果を解析しました。その結果、心臓線維芽細胞から直接誘導された心筋細胞が約2%認められ(図1)、2か月後には心臓のポンプ機能が回復しました。また、心筋梗塞慢性期の梗塞巣が約半分に縮小しました。不整脈や他臓器で心筋細胞が誘導されるなどの有害事象は観察されませんでした。

興味深いことに、心臓組織の網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、心筋ダイレクトリプログラミングにより心不全マーカーの改善に加えて、線維化や炎症に関連する遺伝子の発現が低下することを見出しました。そこで抗線維化作用のメカニズム解明のため、心筋細胞へ転換しなかった心臓線維芽細胞の遺伝子発現を1細胞レベルで明らかにする、シングルセル解析^{注3)}を行いました。これにより、心筋梗塞慢性期の心臓線維芽細胞は7種類の異なる細胞集団から構成されており、さらにその中の線維組織形成を誘導する線維芽細胞(悪玉線維芽細胞)の集団が顕著に増加していることがわかりました。一方、心筋ダイレクトリプログラミングを行うと、悪玉線維芽細胞は線維化関連遺伝子の発現が低い健常線維芽細胞(善玉線維芽細胞)の状態に変化することが明らかになりました。マウス心臓組織切片においても、心臓線維化に特徴的な細胞外基質の沈着が減少していました。これらの結果から、心筋ダイレクトリプログラミン

グには心筋再生効果に加えて、線維芽細胞を悪玉から善玉に転換して梗塞巣を縮小する抗線維化作用があることが示唆されました（図2）。さらに、線維芽細胞が善玉化する機序として、心不全における線維芽細胞の活性化を誘導する鍵遺伝子 Meox1^{註4)} の発現が抑制されることを明らかにしました（図3）。

以上より、心筋ダイレクトリプログラミングは、心臓線維芽細胞からの心筋再生と、線維芽細胞の形質転換による抗線維化作用の両面から、慢性期心筋梗塞の心不全を改善させることが分かりました。

今後の展開

本研究により、心筋ダイレクトリプログラミングが、心筋梗塞が原因となる慢性心不全に対する心臓再生治療として応用が可能であることが示され、新しい心臓再生医療の実現を大きく前進させるものと期待されます（図4）。今後、心筋ダイレクトリプログラミング効率の改善や遺伝子導入方法の開発などを検討するとともに、臨床応用を目指して、さらに研究を進めていきます。

参考図

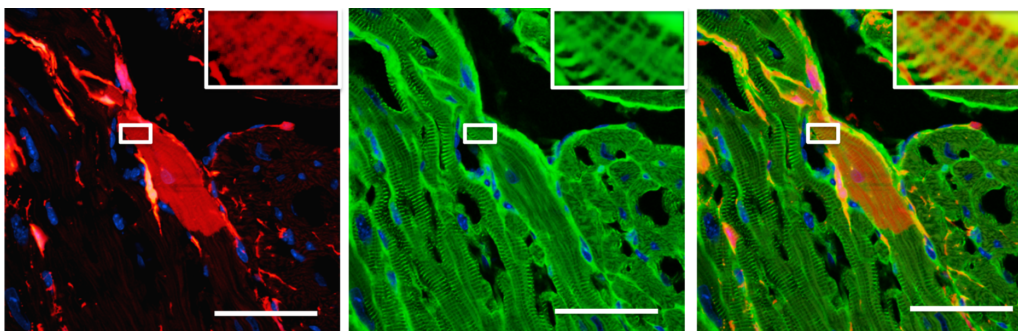


図1 心筋梗塞3か月後の遺伝子改変マウス心臓の観察

タモキシフェン投与により線維芽細胞とその細胞系譜は赤色で標識される。左図は線維芽細胞由来であることを示す赤色蛍光蛋白の発現、中図は心筋構造蛋白であるαアクチニンの発現、右図はこれらを統合した図となる。中図で赤色蛍光蛋白を発現した細胞が心筋蛋白（緑色）を発現しており、線維芽細胞が心筋ダイレクトリプログラミングにより再生心筋に転換したことがわかる（左図との重ね合わせにより右図でオレンジ色）。右上の拡大図は心筋に特徴的な横紋構造を示す。スケールバーは100 μm。

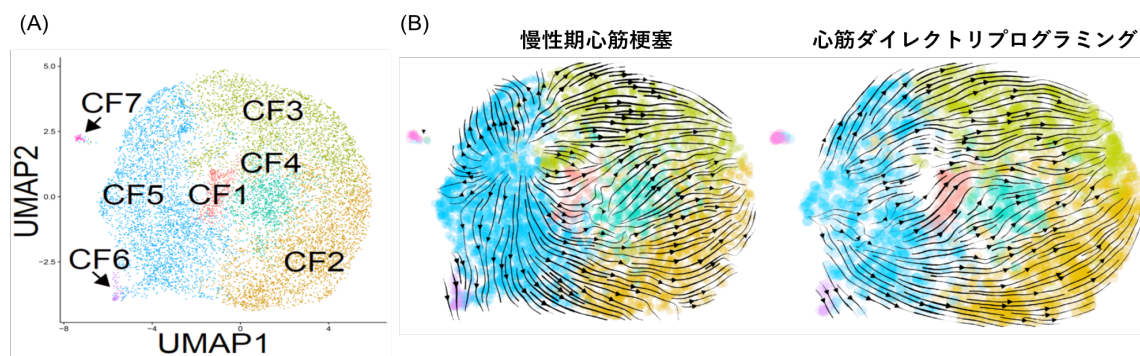


図2 シングルセル解析による心筋梗塞後線維芽細胞の遺伝子発現

(A) 慢性期心筋梗塞の心臓線維芽細胞は7つの細胞集団（CF1～7）に区分される。特徴的なマーカー遺伝子発現解析の結果、CF5、6が心筋梗塞で増加する悪玉線維芽細胞の集団、CF1～4が健常状態で多く存在する善玉線維芽細胞の集団である。

(B) 慢性期心筋梗塞群と心筋ダイレクトリプログラミング群における心臓線維芽細胞のシングルセル解析。心筋梗塞では CF5、6 集団が増加し、心筋ダイレクトリプログラミングでは減少している。心臓線維芽細胞の RNA velocity 解析^{注5)} であり、矢印は状態変化の方向を示す。心筋梗塞では CF5 の矢印が同じ集団内に留まるのに対して、心筋ダイレクトリプログラミングでは CF5 から CF1~4 の方向へと矢印の向きが変化しており、線維芽細胞の状態が悪玉から善玉に変化していることが分かる。

心筋ダイレクトリプログラミング

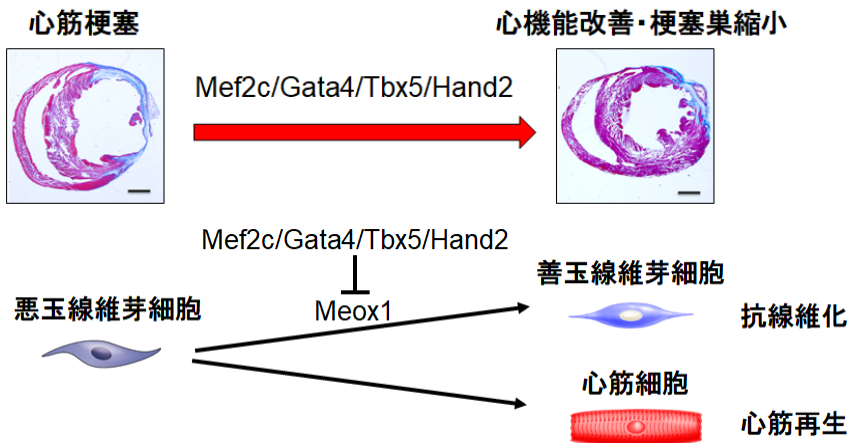


図3 本研究のまとめ

心筋ダイレクトリプログラミングにより慢性期心筋梗塞の心機能が改善し、梗塞巣が縮小する。このとき、心筋リプログラミング遺伝子 (Mef2c/Gata4/Tbx5/Hand2) は Meox1 発現を抑制して心臓線維芽細胞を悪玉から善玉に転換して抗線維化作用を示すとともに、一部の線維芽細胞は心筋細胞に転換して心筋再生する。

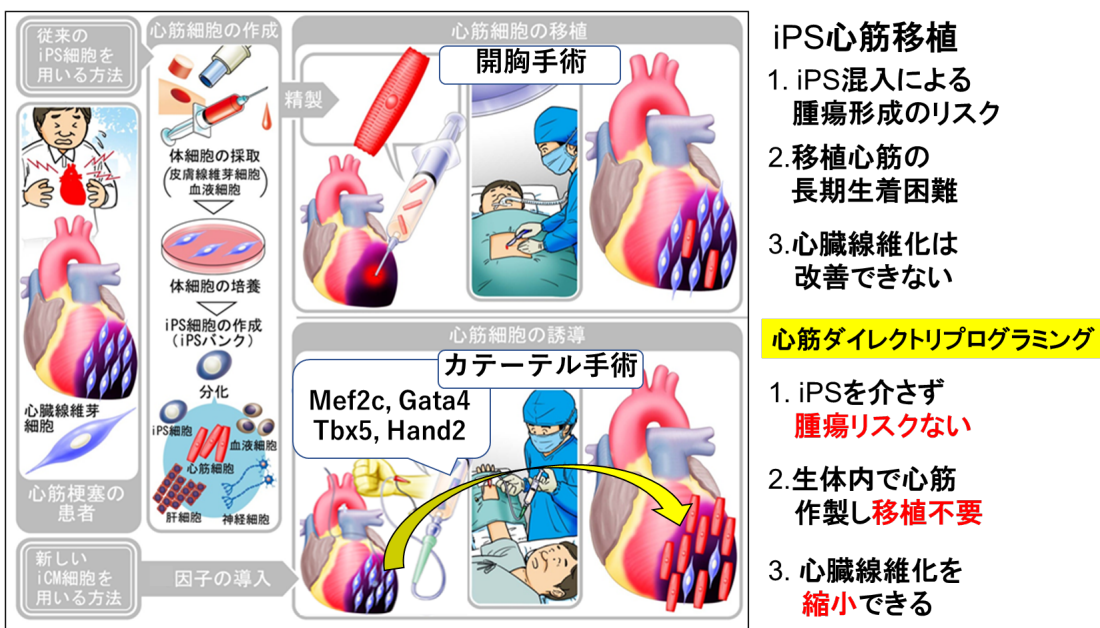


図4 心臓再生法の比較

上段が iPS 細胞を介した心筋細胞移植による心臓再生、下段が心筋ダイレクトリプログラミングを示す。

iPS 細胞を用いた心臓再生では、iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞を心臓に細胞移植するのに対して、心筋ダイレクトリプログラミングでは心筋リプログラミング遺伝子を直接患部の線維芽細胞に遺伝子導入し、心筋再生する。

用語解説

注1) 慢性心不全

心疾患によって心臓のポンプ機能が低下したことに伴い息切れやむくみなどが出現し、慢性的に日常生活に支障がある状態。原因としては、心筋梗塞を代表とする虚血性心疾患が最多である。

注2) 心筋リプログラミング遺伝子

本研究グループが発見した、マウス線維芽細胞から心筋細胞を直接作製するために必要な 3 遺伝子 (Mef2c, Gata4, Tbx5) あるいはこれに Hand2 を加えた 4 遺伝子。

注3) シングルセル解析

1 細胞ごとに転写産物の種類と量を網羅的に推定する解析手法。各細胞に特徴的な遺伝子発現プロファイルや遺伝子発現変化を解析することで、細胞の多様性や、細胞の変化の系譜を可視化することが可能となる。

注4) Meox1 遺伝子

心不全の心臓線維芽細胞で発現が上昇することが知られている転写因子で、線維化に関連する遺伝子群の発現を上昇させ、心臓線維化を誘導する。

注5) RNA velocity 解析

遺伝子発現状態の時間微分から、細胞分化の方向を可視化するシングルセル解析の手法。

研究資金

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の再生医療実現拠点ネットワークプログラム「再生・細胞医療・遺伝子治療研究開発課題」(22bm1123012h0001)、および、再生医療実現拠点ネットワークプログラム「幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム」(20bm0704030h0002)、公益財団法人武田科学振興財団、公益財団法人日本応用酵素協会、公益財団法人 MSD 生命科学財団、科研費 (19K22613, 19K17550, 21K08072, 22H03065) の支援によって行われました。

掲載論文

【題名】 Direct reprogramming improves cardiac function and reverses fibrosis in chronic myocardial infarction.

(直接リプログラミングは陳旧性心筋梗塞の心機能を改善し、心臓線維化を退縮させる)

【著者名】 Hidenori Tani, Taketaro Sadahiro, Yu Yamada, Mari Isomi, Hiroyuki Yamakawa, Ryo Fujita, Yuto Abe, Tatsuya Akiyama, Koji Nakano, Yuta Kuze, Masahide Seki, Yutaka Suzuki, Manabu Fujisawa, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Shigeru Chiba, Keiichi Fukuda, and Masaki Ieda

【掲載誌】 Circulation

【掲載日】 2022 年 12 月 12 日

【DOI】 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.058655

問合わせ先

【研究に関すること】

家田 真樹 (いえだ まさき)

筑波大学 医学医療系 (循環器内科) 教授

URL: <http://www.md.tsukuba.ac.jp/clinical-med/cardiology/>

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報室

TEL: 029-853-2040

E-mail: kohositu@un.tsukuba.ac.jp

慶應義塾大学 信濃町キャンパス総務課

TEL: 03-5363-3611

E-mail: med-koho@adst.keio.ac.jp