

6つの転写因子を用いた成体脂肪組織由来間葉系前駆細胞（ADRC）の 心筋細胞への直接リプログラミング法の開発 ～新たな心筋再生療法開発への期待～

名古屋大学医学部附属病院 循環器内科（現 救急科）の成田伸伍 病院助教、名古屋大学大学院医学系研究科 循環器内科学の海野一雅 助教（現 日本赤十字社愛知医療センター名古屋第二病院 第一循環器内科部長）、循環器内科学の室原豊明 教授らの研究グループは、同大学医学系研究科ウイルス学の佐藤好隆 准教授、および名古屋市立大学医薬学総合研究院大学院医学研究科ウイルス学分野の奥野友介 教授との共同研究により、成体の脂肪組織由来の間葉系前駆細胞（ADRC）に対して、6つの特定の転写因子^{※1}（Baf60c, Gata4, Gata6, Klf15, Mef2a, Myocd）の導入を行うことで心筋細胞へと分化誘導をはかる新たな直接リプログラミング^{※2}法（direct reprogramming）を開発しました。

脂肪には、多分化能を有する脂肪組織由来間葉系前駆細胞（ADRCs:万能細胞）^{※3}が含まれることが明らかとされています。この脂肪由来の万能細胞は、再生医療の供給源として注目を浴び、様々な再生医療分野で臨床応用が検討されています。今回、本研究グループは、ADRCを6つの特定の転写因子で誘導することにより、心筋細胞に非常に類似した細胞を作成することに成功しました。このADRCから作成した細胞を、マウス心筋梗塞モデルに移植したところ、心臓の機能の改善を認めました。心血管疾患は世界的に主要な死因です。日本では、心疾患は第二位の死亡原因であり、さらなる治療開発が望まれています。本結果は新たな心臓再生治療としての可能性を示しています。

本研究結果は米国科学誌である「iScience」（2022年7月15日付の電子版）に掲載されました。

ポイント

- 脂肪組織由来間葉系前駆細胞（Adipose-derived regenerative cells; ADRCs）は、皮下脂肪組織内に存在することがわかっている前駆細胞・再生細胞であり、心筋再生治療の一つとして研究が進められている骨髄由来の幹細胞と同様の特徴を持つとされています。ADRC は、心血管病に対する新しい再生細胞治療の供給源として有望視されています。
- これまでに本研究チームは、血管病である重症虚血肢の患者に対して、ADRC の自家移植治療^{*4}が安全かつ有効であり、血管新生の促進と組織の炎症を抑制することで、損傷した組織を修復できるという臨床結果を報告しています。（参考文献[1]）
- 今回同研究チームは、ADRC に対して目的の遺伝子を導入し細胞の性質を変えるダイレクトリプログラミングという手法に着目しました。ダイレクトリプログラミングを行った ADRC は、心筋細胞に類似した性質を獲得することがわかり、心疾患モデル動物に移植することで心筋再生効果を認めることがわかりました。
- 目的の遺伝子とは、独自に選別された Baf60c, Gata4, Gata6, Klf15, Mef2a, Myocd の 6 つの転写因子になります。ダイレクトリプログラミングを行った ADRC の特徴は、RNA シークエンス解析^{*5}という網羅的な遺伝子の解析により、心筋細胞の特徴に近づいていることが明らかとなっています。
- 幹細胞・前駆細胞^{*6}の中でも、ADRC は比較的容易に採取でき、腫瘍形成能も低く、安全性や倫理的な問題も少ないと考えられています。（参考文献[2]）本研究チームは、ADRC の直接リプログラミングを心筋再生治療の新たな選択肢として研究を続けています。

1. 背景

世界保健機関(WHO)が行った統計によると、2000 年～2019 年の 20 年間の世界の死因の中で、1 位は「虚血性心疾患」という結果であり、死亡者はこの 20 年で 200 万人以上増加して、2019 年には 890 万人に達したとされています。心血管病は、予防法から治療法まで日々進歩を遂げている一方で、多くの患者がこの病気に悩まれていることが現状となっています。この問題に対して、本研究チームは幹細胞・前駆細胞を用いた心血管病の再生治療の研究をこれまで行ってきました。脂肪組織は、心筋再生を含む再生医療において魅力的な細胞供給源であると考えられており、脂肪組織由来前駆細胞が心血管病の再生治療において有力な細胞群であることをこれまでに示してきました。同チームは、マウスモデルにおける下肢虚血に対して ADRC を移植すると、ケモカインの一つで stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)というタンパク質が移植した ADRC より分泌されることで、その周囲の血管新生を促進し、虚血肢の回復を促すことを報告しています（参考文献[3]）。心筋再生について同研究チームは、マウスの心筋梗塞モデルを用いて、梗塞巣に移植された ADRC から血管新生促進因子である血管内皮増殖因子 (VEGF) や塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) が分泌され、血管新生の促進、心筋梗塞サイズの縮小、線維化の抑制、生存率や心機能の向上といった結果が得られていることを報告しています（参考文献[4]）。臨床研究において同研究チームは、自家移植した ADRC が重症虚血肢の患者に安全で有効であり、血管新生を促進し、組織の炎症を抑制することで損傷した組織を修復できたという臨床結果を報告しています（参考文献[1]）。これら背景を踏まえ、本研究では ADRC に対して新たに直接リプログラミング法という手法を用いる研究を行いました。

2. 研究成果

本研究チームは、まず初めに ADRC を心筋細胞へと直接プログラミングするために必要な因子の同定から始めました。RNA シークエンス解析という網羅的な遺伝子の解析を用い、マウスにおける ADRC と心臓組織の遺伝子の発現の違いを調べ、候補の因子を 15 個にまで同定しました (図 1A)。次に、同定した 15 個の候補因子の組み合わせをそれぞれのパターンで比較したところ、最終的に 6 つの因子、Baf60c、Gata4、Gata6、Klf15、Mef2、Myocd の組み合わせを ADRC に遺伝子導入することで、ADRC を最も効率的に心筋様細胞へ誘導することを明らかとしました (図 1B; 細胞は心筋の特徴を持つと GFP^{*7} を発現し、緑色の発光をするようになる)。

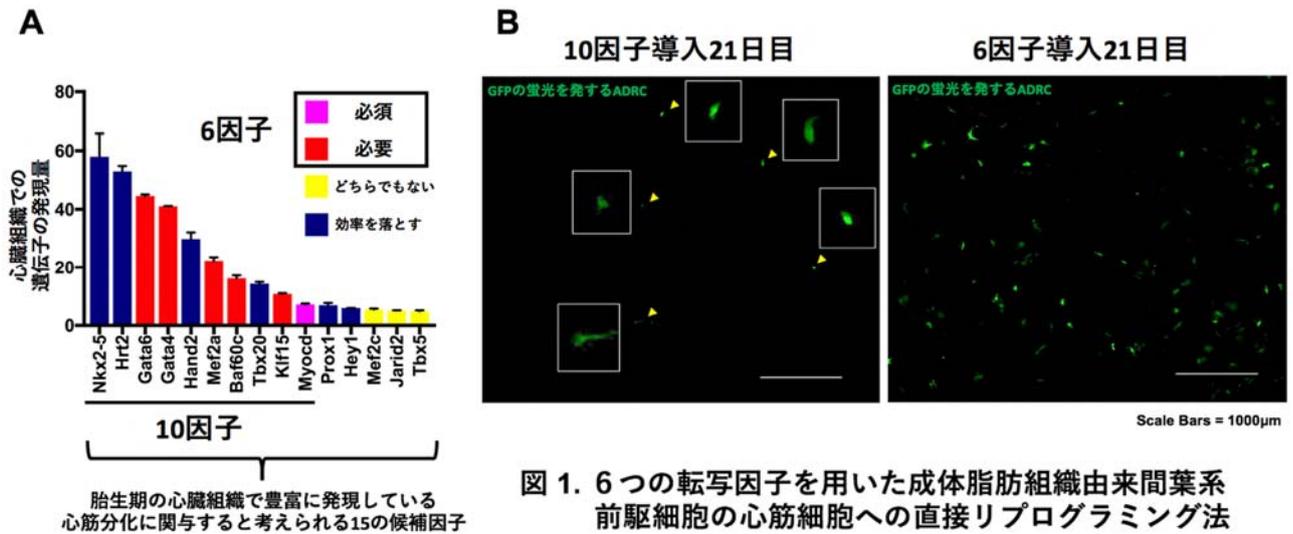


図 1. 6 つの転写因子を用いた成体脂肪組織由来間葉系前駆細胞の心筋細胞への直接リプログラミング法

この 6 因子の遺伝子を導入した ADRC (6F-ADRC) は、顕微鏡で観察すると、心筋細胞を構成するタンパク質である α -サルコメリックアクチンやトロポニン T が細胞内にあることがわかりました (図 2A)。心筋様細胞へと変化している GFP で光る緑色の ADRC のみを集めて RNA シークエンス解析を行うと、様々な心臓関連の遺伝子が発現しており、この遺伝子発現の分布は成体マウスの心室心筋細胞の発現に近づいていることがわかりました (図 2B)。シングルセル RNA シークエンスという単一細胞レベルでの網羅的な遺伝子発現についても調べましたが、これまでの結果と同様に、GFP 陽性の ADRC は心筋細胞に関連した複数の遺伝子を発現しているという結果が得られました (図 2C)。以上のことから、6 因子の遺伝子を導入し直接リプログラミングを行った ADRC は、心筋細胞に向かった分化誘導がなされていることが明らかとなりました。

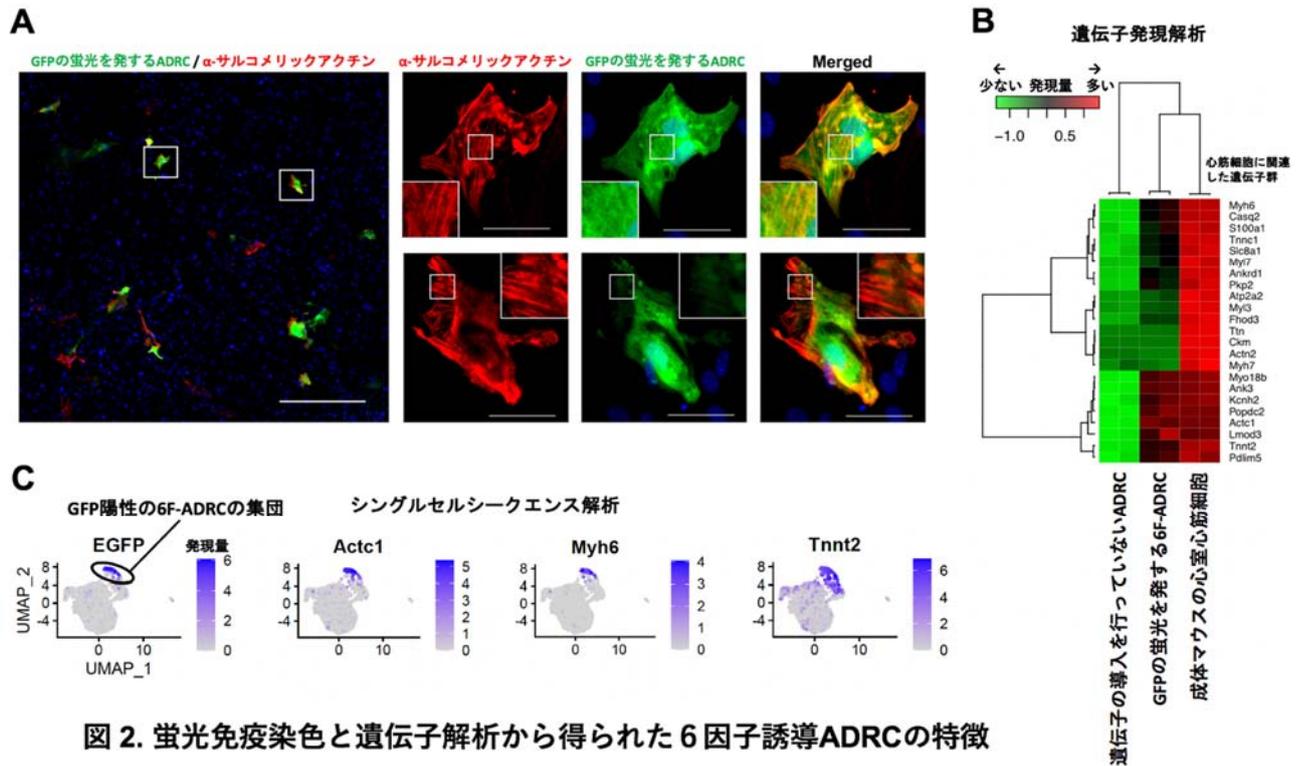


図 2. 蛍光免疫染色と遺伝子解析から得られた 6 因子誘導ADRCの特徴

本研究チームは、6F-ADRC が心臓再生治療に有効なものであるかどうかについて、動物モデルを使って検証を行いました。直接リプログラミングを行った 6F-ADRC を、作成した急性心筋梗塞モデルマウスの梗塞エリアに細胞移植し、1ヶ月の経過を評価しました。結果、6F-ADRC の誘導細胞移植群では、非誘導細胞移植群と比較して生存率が改善する結果となりました（図 3A）。細胞移植後に行った心臓超音波検査では、誘導細胞移植群と非誘導細胞移植群の左室内径短縮率（LVFS）の差が経過時間とともに徐々に明確になり、21、28 日目では誘導細胞移植群で心機能が有意に保持される結果となりました（図 3B）。28 日後の顕微鏡での組織の評価（マッソントリクローム染色）では、梗塞面積および全左室面積が誘導細胞移植群において非誘導移植群より有意に減少していることがわかりました（図 3C）。

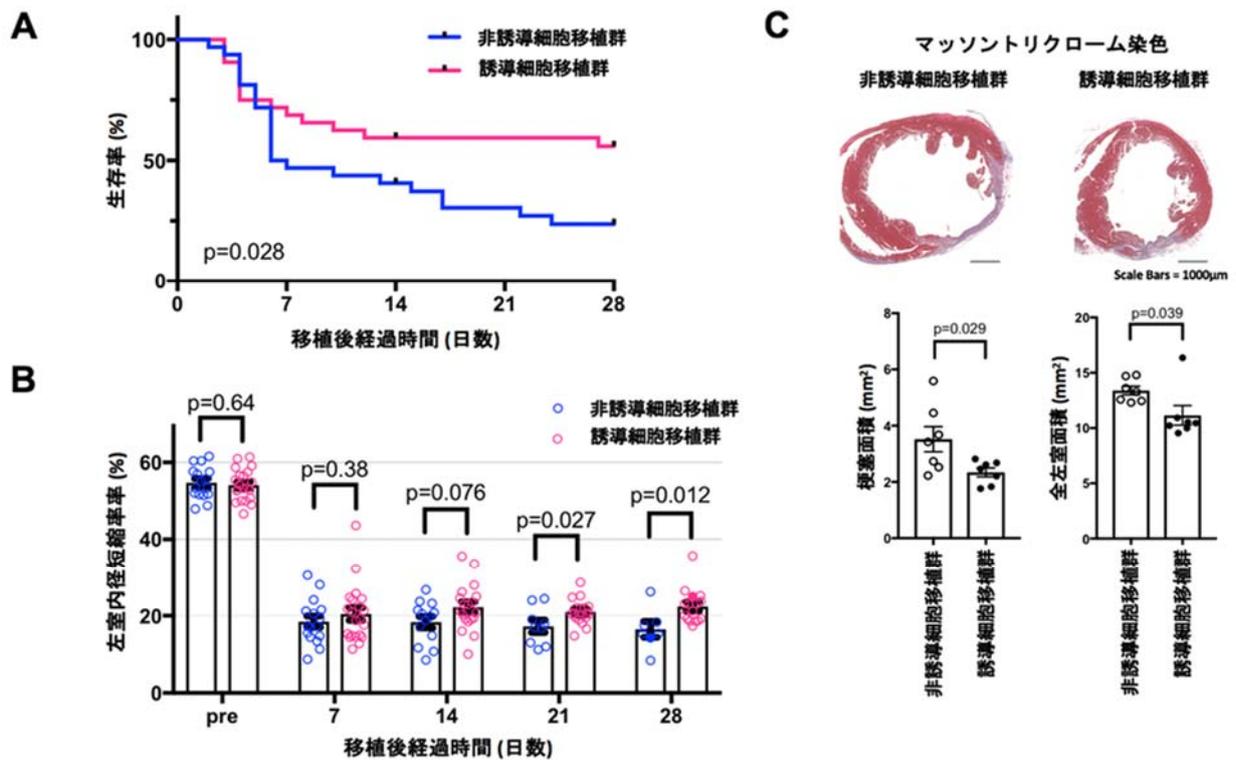


図 3. 6 因子誘導ADRCの心機能改善効果；急性心筋梗塞モデルマウスへの細胞移植による検討

3. 今後の展開

本研究チームは、成体から取り出した ADRC を 6 つの転写因子の遺伝子導入という方法によって心筋様細胞へと分化させることができるという新たな報告を行いました。さらに、誘導をかけた ADRC を動物実験で急性心筋梗塞に移植した場合、心筋細胞としての性質を維持したまま梗塞境界部に長期間留まり、血管新生作用を介した心機能の改善効果があることを示しています。ADRC は幹細胞の中でも比較的容易に採取でき、腫瘍形成能も低く、安全性や倫理的な問題も少ないと考えられて自家移植も可能な細胞治療として有望視されています。今後は本研究成果を受け、ADRC の直接リプログラミングを介した新たな心臓再生治療法を確立することが期待されます。

4. 用語説明

※1 転写因子

DNA に結合することで遺伝子の発現を調節するタンパク質のことであり、DNA の遺伝情報をメッセンジャーRNA に転写する過程を促進、あるいは逆に抑制する働きをする。

※2 直接リプログラミング (ダイレクトリプログラミング、direct reprogramming)

最終分化細胞である体細胞から多能性幹細胞を経ずに、分化の鍵となる特定の転写因子群を遺伝子導入することで、心筋、神経、肝細胞などのさまざまな分化細胞へと直接誘導を行う方法。一方、iPS 細胞は、体細胞から、多能性幹細胞を得る方法であり、iPS 細胞から心筋細胞を作製する手法とは異なる。

※3 脂肪組織由来間葉系前駆細胞 (Adipose-derived regenerative cells; ADRCs) ;
皮下脂肪組織内に存在することがわかっている前駆細胞。ADSC: Adipose Derived Stem Cell (脂肪由来幹細胞) とも表記され、厳密には、ADRC は脂肪吸引などにより得られた脂肪組織から得る、幹細胞に加えて間質細胞、造血系細胞など多様な細胞も含めた細胞群を指し、ADSC は細胞の数を増やす培養という工程を経て生成された幹細胞群を指す。

※4 自家移植治療

自家移植治療とは、ご自分の細胞をあらかじめ採取したあとにご自身の体に戻す移植治療のこと。対して、他人(ドナー)から移植細胞をもらう移植治療を同種移植という。

※5 RNA シークエンス解析

RNA シークエンス解析とは、生体細胞内における遺伝子転写産物(メッセンジャーRNA)の発現状況を網羅的に把握することを目的とした解析で、次世代シーケンサーという装置を用いて遺伝子発現解析を行う方法である。次世代シーケンシングは、数千から数百万もの核酸の塩基配列を同時に高速で読み込むことができる技術であり、2000 年半ばに登場して以来進歩を遂げている。現在では、本研究においても使用したシングルセル RNA シーケンシングという 1つの細胞が発現するメッセンジャーRNA の種類や量の解析についても、次世代シーケンサーを使用することで可能となっている。

※6 幹細胞・前駆細胞

幹細胞は、自己分裂する能力と別の種類の細胞に分化する能力を有する細胞を指す。一方、前駆細胞は、幹細胞から発生し、最終分化細胞へと分化することのできる細胞を指す。前駆細胞を幹細胞と最終分化細胞の中間に位置する細胞と捉えることができる。

※7 GFP (緑色蛍光タンパク質)

青色の光を吸収して緑色の蛍光を発するタンパク質でオワンクラゲから発見された。遺伝子工学を利用し、注目する遺伝子に GFP 遺伝子をつなげて GFP 標識タンパク質を発現させることができ、生命科学研究において広く利用されている。

5. 参考文献

[1] Katagiri T, Kondo K, Shibata R, Hayashida R, Shintani S, Yamaguchi S, Shimizu Y, Unno K, Kikuchi R, Kodama A, Takanari K, Kamei Y, Komori K, Murohara T. Therapeutic angiogenesis using autologous adipose-derived regenerative cells in patients with critical limb ischaemia in Japan: a clinical pilot study. *Sci Rep-uk*. 2020;10:16045.

<https://doi.org/10.1038/s41598-020-73096-y>

[2] Suzuki J, Shimizu Y, Tsuzuki K, Pu Z, Narita S, Yamaguchi S, Katagiri T, Iwata E, Masutomi T, Fujikawa Y, Shibata R, Murohara T. No influence on tumor growth by intramuscular injection of adipose-derived regenerative cells: safety evaluation of therapeutic

angiogenesis with cell therapy. *Am J Physiol-heart C*. 2021;320:H447–H457.

<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00564.2020>

[3] Kondo K, Shintani S, Shibata R, Murakami H, Murakami R, Imaizumi M, Kitagawa Y, Murohara T. Implantation of Adipose-Derived Regenerative Cells Enhances Ischemia-Induced Angiogenesis. *Arteriosclerosis Thrombosis Vasc Biology*. 2009;29:61–66.

<https://doi.org/10.1161/atvbaha.108.166496>

[4] Ishii M, Shibata R, Shimizu Y, Yamamoto T, Kondo K, Inoue Y, Ouchi N, Tanigawa T, Kanemura N, Ito A, Honda H, Murohara T. Multilayered adipose-derived regenerative cell sheets created by a novel magnetite tissue engineering method for myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2014;175:545–553.

<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.06.034>

6. 発表雑誌

掲雑誌名 : iScience

論文名 : Direct reprogramming of adult adipose-derived regenerative cells toward cardiomyocytes using six transcriptional factors

著者 :

Shingo Narita M.D.¹, Kazumasa Unno M.D., Ph.D.¹, Katsuhiko Kato M.D., Ph.D.¹, Yusuke Okuno M.D., Ph.D.², Yoshitaka Sato M.D., Ph.D.^{3,4}, Yusuke Tsumura M.D.⁵, Yusuke Fujikawa M.D.¹, Yuuki Shimizu M.D., Ph.D.¹, Ryo Hayashida M.D., Ph.D.¹, Kazuhisa Kondo M.D., Ph.D.¹, Rei Shibata M.D., Ph.D.⁶, Toyooki Murohara M.D., Ph.D.¹

所属 :

1 Department of Cardiology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya 466-8550, Japan;

2 Department of Virology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya 467-8601, Japan;

3 Department of Virology, Nagoya University Graduate school of Medicine, Nagoya 466-8550, Japan;

4 PRESTO, Japan Science and Technology Agency (JST), Kawaguchi 332-0012, Japan;

5 Department of Pediatrics, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya 466-8550, Japan;

6 Department of Advanced Cardiovascular Therapeutics, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya 466-8550, Japan.

DOI : 10.1016/j.isci.2022.104651

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/iSc_220715en.pdf