

主論文の要旨

**Direct reprogramming of adult adipose-derived
regenerative cells toward cardiomyocytes using six
transcriptional factors**

〔 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
心筋細胞へのダイレクトリプログラミング法 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 循環器内科学分野

(指導：室原 豊明 教授)

成田 伸伍

【緒言】

脂肪組織由来間葉系前駆細胞 (Adipose-derived regenerative cells; ADRCs) は、骨髄由来の幹細胞と同様の特徴を持つ、皮下脂肪組織内に存在する幹細胞であり、虚血性心疾患をはじめとした心血管病に対する再生細胞治療の供給源として有望視されている。ADRCs を心筋細胞へと分化させる試みは多く報告されているが、目的の遺伝子を導入し直接細胞の性質を変えるダイレクトリプログラミングを用いた分化誘導法については今まで検討はされていない。今回我々は、このダイレクトリプログラミング法を用いて、ADRCs を心筋細胞へと分化誘導が可能であるか、また、その誘導細胞が心臓再生治療として有用であるかを検証した。

【方法】

成体の alpha-myosin heavy chain promoter - enhanced green fluorescent protein (α MHC-EGFP) トランスジェニックマウスより抽出した ADRCs に対して、レンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行い、心筋細胞への分化誘導の検証を行った。候補因子については、次世代シーケンサー (Next generation sequencer; NGS) を用いたトランスクリプトーム解析を行い、胎生 11.5 日のマウスの心臓組織から抽出した mRNA と 8 週の成体マウス由来 ADRCs から抽出した mRNA とを比較検討した。ダイレクトリプログラミングによる分化誘導を行った ADRCs の特徴を、定量 PCR、細胞免疫染色、RNA シーケンス解析にて評価した。

続いて、心筋様細胞へと誘導に成功した ADRCs の心臓再生効果について、急性心筋梗塞モデルマウスを用いて検証を行った。ダイレクトリプログラミングを行い 1 週間培養後の ADRCs 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、心臓超音波による心機能評価および、組織学的評価によって検証した。

【結果】

NGS 解析により、ADRCs と比べて胎生期の心臓組織で豊富に発現している遺伝子の中で、心筋細胞への分化に関わると考えられる転写因子をリプログラミングの候補因子として 15 個を同定した (Figure 1A)。その中から、発現量の多い上位 10 の転写因子 (10 因子) を ADRCs へと遺伝子導入することで、1、2 週間前後より α MHC-EGFP 陽性細胞を観察するに至った (Figure 1B)。さらに 10 因子から 6 因子 (*Gata6*、*Gata4*、*Mef2a*、*Baf60c*、*Klf15*、*Myocd*) へと導入因子を絞り込むことで、心筋細胞への分化誘導を示す GFP 陽性細胞の発現がより効率的であり、フローサイトメトリーにて約 5% の陽性細胞が得られることが明らかとなった (Figure 1C)。定量 PCR にて、この 6 因子誘導 ADRCs (6F-ADRC) は、*Myh6* を始め、*Actc1*、*Tnnt2* といった心筋特有の遺伝子発現が有意に上昇していることが示された (Figure 1D)。 α -サルコメリックアクチンによる細胞免疫染色において、アクチン繊維骨格を有する GFP 陽性細胞を観察した (Figure 1E)。

6 因子誘導により得られた α MHC-EGFP 陽性細胞 (GFP⁺6F-ADRC) をソーティングし、

RNA シークエンス解析を行うと、*Myh6*、*Actc1*、*Tnnt2* を含む複数の心筋関連遺伝子の発現が示され、この発現分布は成体マウスの心室心筋細胞と類似していることが明らかとなった (Figure 2A)。gene ontology 解析では、GFP⁺6F-ADRC にて有意に発現が多い遺伝子群の特徴をみると、心筋細胞としての性質を示した遺伝子群であることが明らかとなった (Figure 2B)。シングルセル RNA シークエンスにおいては、EGFP を発現する ADRCs のクラスターと分布を同じくして複数の心筋遺伝子が細胞単位において同時に発現していることが示された (Figure 2C)。

続いて、6F-ADRC を、作成した急性心筋梗塞モデルマウスの梗塞部位に細胞移植し、1 ヶ月の経過を評価した (Figure 3A)。遺伝子の誘導を行っていない ADRCs (Control ADRC) 群と比較して、6F-ADRC 移植群では生存率が有意に改善する結果となった (Figure 3B)。心臓超音波検査では、6F-ADRC 移植群と Control ADRC 移植群の左室内径短縮率 (LVFS) の差が経時的に明確になり、21、28 日目においては、6F-ADRC 移植群で心機能が有意に改善する結果となった (Figure 3C)。組織学的評価では、梗塞面積および全左室面積は、6F-ADRC 群で有意に減少し (Figure 3D)、梗塞巣内に生着した ADRC の数は、6F-ADRC 群で有意に多いことが明らかとなった (Figure 3E)。定量 PCR の結果から、6F-ADRC は、誘導していない ADRCs と比較して、血管新生因子である *VEGF-A*、*VEGF-B* が同程度の発現であることが示されている (Figure 3F)。免疫組織染色では、移植された 6F-ADRC が梗塞境界領域で観察され、cardiac troponin T (cTnT) と *VEGF-B* の発現が認められた (Figure 3G)。CD31 免疫染色では、梗塞内における血管新生が 6F-ADRC 群において有意に促進していることが示された (Figure 3H)。

【考察】

本研究により、6 因子を用いたダイレクトリプログラミングによって、ADRCs を心筋様細胞へと分化誘導する新たな方法が示された。誘導された ADRCs は、約 5% の α MHC-EGFP 陽性細胞を認め、陽性細胞からは複数の心筋遺伝子が発現し、心筋細胞としての特徴を有していることが遺伝子解析の結果から明らかとなった。さらに、6 因子導入 ADRCs を急性心筋梗塞の病巣に移植した場合、心筋様細胞としての性質を維持したまま、より親和性を持って梗塞境界部に長期間生着することが示された。iPS 細胞より誘導された心筋細胞は、移植モデルにおいて高い生着率を得るための最適な分化段階が存在することが報告されており、同様に 6 因子導入 ADRCs の心筋様細胞への分化過程が生着率の向上に寄与したと推察される。加えて、6F-ADRC は、*VEGF-A*、*VEGF-B* といった血管新生因子を誘導前 ADRCs と同様に分泌することにより、パラクライン作用を介した血管新生を促すことで生存率の向上、心機能の改善、左室リモデリングの抑制効果を示す結果に繋がったと考えられる。

現在の心臓移植は効果的な治療法であるが、ドナー不足から移植待機者、待機期間は増加の傾向を示しており、新しい心臓再生治療の実用化が強く望まれている。心臓再生治療の最新の研究としては、iPS 細胞から再生心室筋細胞を精製し、心筋球として移植する方法や、シート状に加工して移植する方法の開発が進められている。iPS 細

胞由来心室筋細胞は、移植により心室筋としての性質を発揮することで心不全を根本から治療することができるものと考えられている。一方で、臨床実用化への課題としては、腫瘍形成、不整脈誘発などの副次的作用の懸念があり、また大量培養に対して大きなコストが発生すること、他家移植における免疫反応といった点が残されている。これに対し、ADRCsを用いた再生治療の利点として、①脂肪組織という豊富な供給源とADRCsが大量培養可能という性質から、自家移植が可能であり、コストや宿主免疫反応の問題は解決できること、②すでにADRCs自体は臨床研究として移植が実施されており、安全性については一定の成績を得ていること、③同時に心機能改善効果も示唆されていること、が挙げられる。

本研究の結果から、6因子で誘導されたADRCsは、心室筋として病的組織を完全な心筋組織へと再生する効果までは至っていないが、これまでの未誘導のADRCs移植と比較してより親和性を持って組織に生着し、血管新生を介した心臓再生効果を示している点で、再生治療の選択肢として進歩した方法であると考えられる。ADRCsを心臓再生治療へ用いることは、先行の臨床研究から安全性が確認されており、実用的な手段であると考えられる。そして、このダイレクトリプログラミング法をより改良し、ADRCsを心筋細胞へと近づけることができれば、さらなる発展が生まれるものと期待できる。

【結語】

我々は、新しいダイレクトリプログラミング法を開発するに至った。独自に特定した6つの転写因子を、成体マウス由来のADRCに遺伝子導入することにより、ADRCsが心筋細胞と類似した遺伝子発現パターンを示すことを明らかとした。さらに、6因子誘導ADRCsを虚血性心疾患モデルマウスに細胞移植することで、心臓の再生治療効果を示す結果を得た。今後、さらに誘導方法を改良し、またヒトADRCsにも同様の誘導方法を適用することで、心臓再生治療に向けた発展が期待される。