

## Review

【分科会特集 〈小児心血管分子医学研究会〉】

# ダイレクトリプログラミングによる心血管発生と 再生医学への新しい展開

藤田 諒<sup>1)</sup>, 貞廣 威太郎<sup>2)</sup>, 家田 真樹<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 筑波大学医学医療系トランスボーダー医学研究センター再生医学分野<sup>2)</sup> 筑波大学医学医療系循環器内科

## Direct Reprogramming as a Novel Approach for Cardiovascular Regeneration

Ryo Fujita<sup>1)</sup>, Taketaro Sadahiro<sup>2)</sup>, and Masaki Ieda<sup>2)</sup><sup>1)</sup> Division of Regenerative Medicine, Transborder Medical Research Center (TMRC),  
Faculty of Medicine, University of Tsukuba, Ibaraki, Japan<sup>2)</sup> Department of Cardiology, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, Ibaraki, Japan

Direct cellular reprogramming provides a new strategy for tissue regeneration, especially to the adult heart. However, endogenous cardiomyocytes have limited regenerative capacity. Since our first report of direct cardiac reprogramming from cardiac fibroblasts with three cardiac developmental transcriptional factors (Gata4, Mef2c, and Tbx5), numerous international studies have been reported to reveal the molecular mechanisms of cardiac reprogramming and improve the efficiency of this nascent technology for cardiac regenerative medicine. These advancements include additional transcriptional factors, microRNAs, epigenetic factors, secreted factors, and cellular microenvironment. Cardiac reprogramming of human fibroblasts has also improved. Although direct cardiac reprogramming may resolve the difficulties in applying induced pluripotent stem cells for cardiac regeneration, numerous challenges remain for future clinical application. In this review, we will provide an update on recent advances in research on direct cardiac reprogramming and discuss the perspectives and challenges of this technology in clinical applications.

**Keywords:** direct reprogramming, cardiac regeneration, transdifferentiation, cardiomyocytes

心筋細胞は再生能を持たず、心臓が障害を受け心筋細胞が壊死した場合、損傷部位は線維芽細胞によって占有されるため、致死的な不整脈の発生源や心筋収縮能の低下を引き起こす。薬物療法やペースメーカーなどの治療法が適応とならない重症心不全では心臓移植や人工心臓が根本治療となり得るが、ドナー不足や合併症などの課題が残る。現在は、iPS細胞から誘導した心筋細胞による再生医療が期待され精力的に研究が進められているが、未だ腫瘍形成の可能性などの課題を抱えている。2010年に我々が開発したダイレクトリプログラミングによる心筋細胞誘導法はiPS細胞が抱える課題を解決できる可能性があり、我々の発表以降、多くの研究者によって新たな心臓リプログラミング因子や機構があることが報告されている。本レビューでは、ダイレクトリプログラミングによる心臓再生・形成における最新の知見をまとめ、また我々が開発したより安全なベクターによる生体内心筋誘導法についても言及し、今後の心筋再生医療の可能性と課題について報告したい。

## はじめに

超高齢化社会に足を踏み入れた我が国において心不全患者は急増している。さらに生活習慣の欧米化に伴い、ますますその数に拍車がかかることが予想されている。現在、心臓病は日本での死因の中で悪性腫瘍に次ぐ第2位となっている。心臓の約30%を構成する心筋細胞は終末分化した細胞であり、増殖能を持たないことから心筋梗塞や心不全などの心疾患により一度壊死してしまった場合、心臓線維芽細胞によって収縮能を持たない瘢痕組織に置換されてしまう。薬物療法やペースメーカーなどの従来の治療法の適応とならない重症心不全では、心臓移植が最終手段となる。しかし、我が国ではドナー不足や拒絶反応、費用などの観点から移植のハードルは高く、心臓再生医療が大きな注目を集めている。失われた心筋を補充する治療法としてES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞から誘導した心筋細胞による再生医療が期待されている。しかし、失われた心筋細胞を置換するだけの膨大な細胞量を得るまでの莫大なコストがかかることや、未分化細胞の混入による腫瘍形成の危険性や生着効率の低さなどが懸念されており、幹細胞や細胞移植を必要としない画期的な新しい治療方法の開発が重要である。さらに心負荷や心筋障害後の結果生じる瘢痕化した障害部位は収縮能を持たないばかりか、瘢痕化した組織が原因となり誘発される致死的不整脈は予後不良因子となるため、心筋再生と並行して線維化領域の縮小が鍵となる。このような幹細胞由来の細胞移植の課題を解決するための新たな再生医療の方法の一つとして、“ダイレクトリプログラミング”が挙げられる。この方法は線維芽細胞などから直接、iPS細胞などの未分化細胞を介さずに目的の細胞を作り出す画期的な手法である。我々の研究グループでは、心筋梗塞後の瘢痕組織を形成する線維芽細胞に心筋特異的な遺伝子を導入し、生体内で心筋を作り出すことに成功した。本稿では、心筋ダイレクトリプログラミングの発見、これまでの発展の歴史、そして最新の知見を踏まえながら、今後の基礎研究の課題と展望、臨床応用の可能性について概説する。

### 心筋ダイレクトリプログラミング因子の発見

ダイレクトリプログラミングという概念自体は意外と古く、1987年に骨格筋のマスター因子としてMyoDが同定され、MyoDの遺伝子を線維芽細胞で強制発現させることで、骨格筋の元になる筋芽細胞を

作り出すことに成功したのが最初のダイレクトリプログラミングの報告である<sup>1)</sup>。その後、世界中の研究者が各臓器への分化転換を促すリプログラミング因子の探索に乗り出したが、単一の細胞特異的な因子の同定には至らなかった。2006年に山中らによってES細胞に発現するOct4, Sox2, Klf4, c-Mycの4つの転写因子を人工的に線維芽細胞に発現させると、細胞が初期化されiPS細胞が作製されることが示され、複数因子の組み合わせによる特定の臓器へのリプログラミング研究が大きく加速した<sup>2,3)</sup>。

そして心筋リプログラミングにおいては、2010年に我々が世界で初めて線維芽細胞を拍動心筋へと誘導することに成功した<sup>4)</sup>。心筋リプログラミング因子の同定に向け、始めに我々は成熟分化した心筋細胞でのみ特異的に蛍光タンパクGFPを発現する $\alpha$ ミオシン重鎖(MHC)-GFPマウスを作製し、線維芽細胞(GFP陰性)から心筋細胞(GFP陽性)の誘導を定量的に測定しスクリーニングできる方法確立した。この実験系を用いて、胎児期心筋細胞に特異的に発現し、且つ心臓発生に重要な14個の遺伝子を絞り込んだ。さらに、その14因子のレトロウイルスベクターを作成し、それぞれの遺伝子を線維芽細胞に導入することで最終的にGata4, Mef2c, Tbx5 (GMT)を心筋ダイレクトリプログラミング因子として同定した(Fig. 1)。この3因子を線維芽細胞に導入することで心筋特異的な遺伝子発現パターンが認められ、さらには $\alpha$ アクチニンや心筋トロポニン(cTnT)などの収縮

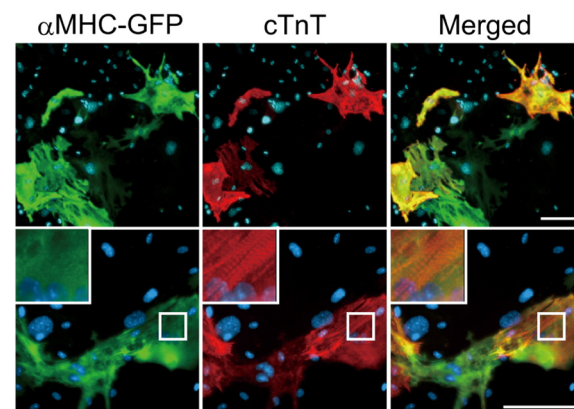


Fig. 1 Combination of three transcriptional factor (Gata4, Mef2c, and Tbx5; GMT) induces  $\alpha$ MHC-GFP reporter (green) and cardiac troponin T (red) in fibroblasts

Induced cardiomyocytes expressed both cardiac specific factors show clear sarcomeric structure. Scale bar, 100 $\mu$ m. Reproduced from Ref. 4.

関連タンパク質の発現とサルコメア構造が確認された (Fig. 1). また誘導された心筋細胞 (induced Cardiomyocyte: iCM) の一部で, 新生児心筋細胞と非常によく似た活動電位が観察され, 自律拍動を認めたことから, 誘導された iCM は生理的にも心筋細胞に近い性質を持つ細胞であることが明らかとなった<sup>4)</sup>.

近年, 他のグループからの研究成果により, iCM の詳細な特徴も徐々に明らかになりつつある. Zhou らは同一のマウスから誘導した iPS 細胞由来心筋と iCM の遺伝子発現を比較した<sup>5)</sup>. その結果, iCM のほうがより成熟心筋細胞に近い遺伝子発現プロファイルを示すことを明らかにした. 具体的には iPS 細胞由来心筋は解糖系主体の代謝プロファイルを示すのに対し, iCM は成熟心筋における主要なエネルギー産生系である脂肪酸酸化などの酸化的リン酸化主体の代謝プロファイルを示した. また細胞周期に関連する遺伝子発現も iCM は抑制され, 成熟心筋に近いことが明らかとなった. これらの結果が意味することは, 心筋ダイレクトリプログラミングは腫瘍形成などのリスクが低いばかりでなく, 誘導された心筋自体の成熟度が高いことから, 疾患モデルや薬剤スクリーニングなど心筋再生医療を大きく発展させる可能性を秘めている.

### 生体内心筋ダイレクトリプログラミング法 による心臓再生

GMT によって生体外で心筋を誘導することが可能になったことから, 生体内でも同様に iCM 細胞が誘導できるかをマウス急性心筋梗塞モデルで検討を行った<sup>6)</sup>. 成熟心筋細胞でのみ特異的に GFP を発現する  $\alpha$ MHC-GFP トランスジェニックマウスを用いて, 冠動脈を結紮した心筋梗塞モデルの梗塞部位に, リプログラミング因子を直接注入した. はじめにウイルスベクターが梗塞部位において, 心筋線維芽細胞以外の細胞には感染していないことを確認した. GMT を心筋梗塞部位に注射した群では, 2 週間後に一部の梗塞部の心筋線維芽細胞で心筋遺伝子が誘導されたが, その多くは未熟な心筋様細胞であった. 原因として 3 因子を, それぞれ別々のウイルスとして作成したため, 遺伝子が十分に細胞内に導入できていない可能性が示唆された. そこで, GMT を 1 つの遺伝子上に設計したウイルスベクターを開発し, 心筋梗塞部位へ注入したところ, GFP 陽性, 即ち  $\alpha$ MHC を発現する細胞が観察され, さらに梗塞巣に誘導された iCM のうち約 30% にサルコメア構造が認められた<sup>6)</sup>. この報告とは

ば同時期に海外の 2 つの研究室から同様の報告がなされている. Qian らは心筋線維芽細胞を特異的に追跡するために, 線維芽細胞に多く発現する Periostatin (Postn) あるいは, Fibroblast-specific protein (Fsp-1) の発現下で Cre recombinase を誘導するマウスを作成し, これらのマウスの心筋梗塞部位に GMT を導入することで, Postn 陽性, あるいは Fsp1 陽性の心筋線維芽細胞が心筋へリプログラミングされていることを証明した<sup>7)</sup>. また, Song らは心筋へのダイレクトリプログラミング因子の GMT に加え, Hand2 (GMHT) を含めることで心筋梗塞部位での心筋ダイレクトリプログラミングが効率よく起こることを示した<sup>8)</sup>. さらに驚くべきことに, これらの報告では梗塞部位の減少や心機能改善などの治療効果を示すことも併せて報告された<sup>7,8)</sup>. これらの結果により, ダイレクトリプログラミングは心筋障害により置き換わった心筋線維芽細胞を機能的な心筋にリプログラムすることが可能であり, 新規の心臓再生医療になりうる可能性が示された. さらに, 後述するように今後はヒト細胞を使った検証や, より安全で効率が良いベクターの開発を進めることで, 一層ダイレクトリプログラミングによる心臓再生医療の実現の未来が近づくだろう.

### ヒト線維芽細胞から心筋への ダイレクトリプログラミング因子の探索

マウスでの生体内リプログラミング実験の成功の結果を受け, 次に臨床応用を目指したヒト心筋線維芽細胞における心筋リプログラミング研究が行われた. 我々はマウスにおける iCM 誘導と同様の方法でヒト心筋誘導を試みたが, マウスで用いた 3 因子 GMT のみでは, ヒト線維芽細胞を心筋に誘導するには十分でないことが分かった. そこで, ヒト心筋ダイレクトリプログラミング因子のスクリーニングに新たに着手し, GMT に加え Mesp1, Myocd を追加した 5 因子 (GMTMM) がヒト心筋ダイレクトリプログラミングに必須であることを報告した<sup>9)</sup>. しかし, 誘導されたヒト iCM はサルコメア構造や心筋特異的なタンパク質を発現することが確認されたが, 一方で心筋特有の自律拍動は観察されなかった. 一方で, ヒト iCM をラット心筋細胞と共培養することで同期収縮がみられたことから, GMTMM によってヒト心筋線維芽細胞を心筋様細胞に誘導できることが示唆された. 同時期に, 海外の研究室からもヒト心筋ダイレクトリプログラミング因子として, Gata4, Tbx5, Hand2, Myocd, miR-1, miR-133 の 6 因子や, GMT に Mesp1, Myocd,



Esrrg, Zfp2 を加えた 7 因子によってヒト線維芽細胞を心筋誘導できたと報告されている<sup>10,11)</sup>。しかし、これまでヒト iCM において自律拍動した報告はなく、マウスに比べ心筋誘導効率が低く、より多くの遺伝子が必要となるため、今後さらなる転写因子探索や培養条件の検討が必要である。

近年のシングルセル解析の発展に伴い、これまでヒト細胞における心筋ダイレクトリプログラミングが困難である理由や心筋リプログラミングにおける過程が徐々に明らかになりつつある。Qian らのグループはヒト線維芽細胞に心筋リプログラミング因子を導入後、さまざまなタイムポイントでシングルセル RNA sequencing (scRNA-seq) を行った<sup>12,13)</sup>。マウス線維芽細胞と同様に細胞周期の活性化状態、即ち増殖期の細胞において、リプログラミング効率が有意に低下することが明らかとなった点に加え、彼らは心筋リプログラミング因子導入後にヒト線維芽細胞が心筋細胞になるか (Reprogramming route)、あるいはならない (Refractory route) という “decision point” を RNA velocity 解析によって見極めることに成功した。しかしながら、具体的にこの “decision point” が何によって規定されているかは明らかでなく今後の課題である。また、マウス線維芽細胞から心筋細胞へのリプログラミングにおいては、炎症や免疫反応が心筋リプログラミングの障壁になることが報告されているが、ヒトにおいては全く逆の結果を示した点は非常に興味深い。自然免疫受容体 Toll-like receptor 3 (TLR3) を心筋リプログラミング因子導入後に抑制した場合、心筋リプログラミング効率が有意に低下することがわかった。この原因として、TLR3 を含む自然免疫系シグナルは心臓関連遺伝子 (Myh6/7) における DNA のメチル化状態を変容させる可能性が示されている。このように、マウスとヒトではリプログラミングに重要な要素が大きく異なる可能性があり、マウスで得られた知見が必ずしも正しいとは限らないことを意味している。今後の基礎研究として、マウス細胞を用いたより詳細な分子生物学アプローチに加え、臨床応用に向けては実際のヒト検体を用いた基礎研究を同時に行っていく必要があるだろう。

### 高効率な心筋ダイレクトリ プログラミング法の開発と現状

2010 年に我々が最初の心筋ダイレクトリプログラミングを報告して以来<sup>4)</sup>、我々を含む国内外のさまざまな研究室が、心臓ダイレクトリプログラミング法

のさらなる改良を進めている<sup>14)</sup>。心筋へのダイレクトリプログラミングを促す新たな転写因子の探索に加え、microRNA (miRNA) を介した心筋誘導などが報告されている。また、別のアプローチとして、細胞培養時の基質の検討、サイトカインや薬剤の付与などもこれまで数多く検討されている。

miRNA はタンパク質をコードしない 21-24 塩基程度の小さな RNA であり、mRNA からタンパク質への翻訳抑制や mRNA の分解による転写後制御を行なっている。また miRNA の大部分が異なる種間でも保存されているという特徴がある。Jayawardena らはレンチウイルスを用いて 4 つの miRNA (miR-1, miR-133, miR-208, miR-499) を心筋梗塞後のマウス心臓に直接投与することで、心筋ダイレクトリプログラミングに成功し、心機能の改善と線維化の低下が起きることを報告した<sup>15)</sup>。また、我々によって行われた研究によって GMT に miR-133 を加えると短期間で効率よく心筋が誘導できることが明らかになった<sup>16)</sup>。さらにこの論文の重要な点として、miR-133 はマウスだけでなく、ヒト線維芽細胞における心筋誘導効率を 10 倍程度改善することに成功し、miRNA がヒト心筋のダイレクトリプログラミングにも大きな役割を担う可能性が示された。この機序としては、miR-133 が上皮間葉転換のマスター因子である Snail のタンパク質発現を抑えることで、線維芽細胞関連遺伝子の遺伝子発現を抑制していることが考えられる<sup>16)</sup>。これらの結果は線維芽細胞としての形質を抑えつつ、心筋誘導を行うことがより効率的な iCM を誘導する上で重要であることを示している。

ダイレクトリプログラミング効率を劇的に上昇させる増殖因子の発見は簡便・安全という観点から臨床応用にとって重要な発見である一方で、実際の実験現場で使用される増殖因子は非常に高価であり、より低コストな低分子化合物等で置き換える手法も試みられている。Zhao らは線維芽細胞の形質維持機構が心筋へのリプログラミングを阻害していると考え、線維芽細胞の増殖能や遊走能に重要な分子である TGF- $\beta$ , ROCK, Wnt に着目した。Zhao らは TGF- $\beta$ , ROCK 経路を低分子化合物で阻害することにより、心筋ダイレクトリプログラミングの効率が促進するだけでなく、より早期に拍動する心筋細胞がマウス胎児線維芽細胞から得られることを報告した<sup>17)</sup>。また、Mohamed らも、5,500 種類の化合物からスクリーニングを行い、Wnt シグナルや TGF- $\beta$  シグナルの阻害薬によって、GMT による心筋ダイレクトリプログラミングの誘導効率が上昇することを報告している<sup>18)</sup>。その他にも

心筋ダイレクトリプログラミングを促進するシグナル伝達経路として、Akt シグナルの重要性が示唆されている。Hashimoto らは GMHT に加え、Akt1 を過剰発現させることで、心筋リプログラミング効率の改善に成功した<sup>19)</sup>。さらに、Akt1 を入れた場合はより成熟した心筋が誘導されることも同時に示している。

適切な培養条件が効率的なリプログラミングを左右する重要な因子であることは、生物の発生過程において周囲の環境（ニッチ）が細胞運命決定に重要な役割をしていることから疑う余地がない。特に周囲の細胞から放出される液性因子や細胞間接着及び、細胞外マトリクスとの接着などを含むニッチとの相互作用や機械刺激（メカノストレス）は細胞の運命選択において非常に大きな役割を果たすと考えられている。iPS 細胞から心筋を効率よく誘導するためには、無血清培地に生体内での心臓発生時のシグナルを模倣するような化合物や増殖因子を加えることが知られている。このような背景から、我々の研究グループは心筋誘導因子の中から、心筋ダイレクトリプログラミングの効率を劇的に変化させるものがあるかを独自にスクリーニングした。その結果、線維芽細胞増殖因子である FGF2, FGF10, 血管内皮細胞増殖因子 VEGF を同定し、これらを培地に付加することで、従来の方法に比べて 40 倍の効率で、拍動心筋を誘導できることを明らかにした<sup>20)</sup>。さらにこれらの因子があることで Gata4 の内在性の発現を誘導するために、Mef2c, Tbx5 の 2 つの遺伝子のみで心筋誘導をすることが可能になった。

細胞間、細胞外マトリックスを介したメカノストレスはクロマチン状態の変化を誘導し遺伝子発現変化に影響を与えることが知られている。実際に 3 次元ハイドロゲルで培養すると、2 次元の通常培養に比べ miRNA を介した心筋ダイレクトリプログラミング効率が上昇するということがすでに報告されている<sup>21)</sup>。通常の培養皿の硬さは 1 GPa 程度にあるのに対して、筋肉や心臓は 8–17 kPa と非常に柔らかい。実際に、我々は近年 GMHT による胎児線維芽細胞からの心筋ダイレクトリプログラミングをより生体心筋に近い硬さ（8 kPa）のハイドロゲルで培養することで、より効率よく心筋を誘導できることを報告した<sup>22)</sup>。機序としては、細胞接着に関与するインテグリン受容体の下流に存在する転写共役因子 YAP/TAZ の発現を抑制することで線維芽細胞関連遺伝子の発現を抑え、心筋誘導効率を上昇させると考えている。

心筋ダイレクトリプログラミングの大きな障壁は線

維芽細胞の形質維持機構に加え、加齢変容が挙げられる。胎児線維芽細胞と比較して、成体の線維芽細胞における心筋リプログラミング効率は有意に低下する。その具体的な分子機序が明確でないばかりでなく、実際の臨床応用においては胎児や未熟な細胞を対象にすることはないため、成体の線維芽細胞で効率よく心筋を誘導することが望まれる。そこで、我々は 8,400 種類の化合物ライブラリーから、心筋誘導を促進する 4 つの化合物を同定した。その中でも特に、臨床でも汎用されている非ステロイド性抗炎症薬ジクロフェナクが加齢に伴う炎症を抑制することで、これまで誘導が困難であった成体マウス線維芽細胞から心筋へのダイレクトリプログラミング効率を改善することを証明した<sup>23)</sup>。このように線維芽細胞自身が出す炎症物質やその経路を低分子化合物や既存の薬剤等で遮断することで、安価で効率的な心筋誘導法が確立される可能性が示された。

今後はさらなる新しい知見を積み上げることはもちろんのこと、これまでの発見をさらに緻密に精査し改善していく必要がある。例えば、心筋リプログラミングにおいて、導入因子の量的バランスが心筋誘導効率に重要な可能性が示唆されている。Wang らは GMT の 3 因子のうち、Mef2c の発現を高め、逆に Gata4, Tbx5 の発現を弱めることで心筋リプログラミングが促進すると報告しており<sup>24)</sup>、今後 GMT の量的バランスをさらに詳細に検討する必要があるだろう。また各転写因子が果たす役割についてもさらなる検討が必要である。これまでに、ChIP シーケンシング等の手法によって、GMT 導入後、速やかに線維芽細胞関連遺伝子のエンハンサー領域がサイレンシングされ、心筋関連遺伝子のエンハンサー領域が活性化されることが報告されている。これに加え、Hand2 や Akt1 を加えることで、GMT がより同調し、心臓関連遺伝子のエンハンサー領域に集積することでターゲット遺伝子の発現を高めることが示された<sup>19)</sup>。また Stone らは Mef2c と Tbx5 の導入によって、クロマチンのリモデリングが誘導され、特定の遺伝子領域にアクセスしやすくなる状態を作り出すことで、心筋誘導を促すことを報告している<sup>25)</sup>。各リプログラミング因子が持つ役割を詳細に解析することで、各因子の導入や発現のタイミングなどの検討も今後重要なファクターとなってくることが予想される。

さらに、これまでにベクターによる遺伝子導入を全く用いない低分子化合物のみでの心筋細胞誘導も報告されている<sup>26,27)</sup>。Cao らは 9 つの低分子化合物を入れることで、ヒト線維芽細胞を機能的な心筋に誘導で

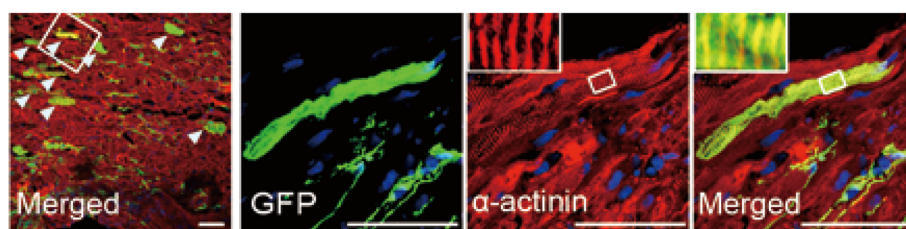


Fig. 2 *In vivo* delivery of Sendai virus GMT vector induces cardiac reprogramming after myocardial infarction

Induced cardiomyocytes (GFP<sup>+</sup>) express  $\alpha$ -actinin with clear sarcomeric structure. Scale bar, 100  $\mu$ m. Reproduced from Ref. 29.

きると報告している<sup>27)</sup>。一方で、この手法による誘導では、心臓前駆細胞の遺伝子発現が誘導されており、線維芽細胞から直接心筋細胞を誘導する GMT によるダイレクトリプログラミング法とは、異なる機序であることが示唆される。しかし遺伝子やウイルスベクターを用いないことでより安全で、細胞培養等における制御も比較的容易いことがメリットであり、今後それぞれの低分子化合物の心筋特異的遺伝子への影響を明らかにすることで、新たな方法が開発されることが期待される。

このような心筋誘導効率を上昇させる研究とは別に、多分化能・増殖能をもつ心臓幹細胞を誘導するという研究も心臓再生医療にとって重要である。我々の研究グループの Sadahiro らは胎児期の心臓を含めた中胚葉に広く発現する転写因子 Tbx6 を ES 細胞・ヒト iPS 細胞といった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効率よく増殖可能な心臓中胚葉様細胞を誘導できることを見出した<sup>28)</sup>。また Tbx6 の発現期間を調整することで、同じく中胚葉である骨格筋や軟骨細胞を誘導することが可能であることを同時に発見し、Tbx6 の発現とその期間が中胚葉組織の運命決定に重要であることが明らかとなった。Tbx6 が心臓中胚葉を誘導する分子メカニズムとしては、Tbx6 は心臓発生に重要な Mesp1 や BMP4 といった遺伝子発現を一過性上昇させることで、心臓中胚葉を誘導することが示された。さらに重要な点として、心臓中胚葉は心筋だけでなく、平滑筋や血管内皮細胞などの心臓を構成する細胞へと分化する能力を持つことから、今後さらなる詳細な検討を行うことで、胎児期や新生児期のような再生能力をもった心筋に加え、心臓を構成する血管内皮細胞や平滑筋などの非心筋細胞を生体内で同時に誘導できる画期的な方法が実現できる可能性を秘めていると言えるだろう。

### 心筋リプログラミングの臨床応用に向けて

このようにこれまで多くの研究によって、心筋ダイレクトリプログラミングが少しずつ応用に向け進歩している。しかし、当初の目的である臨床応用にあたっては未ださまざまな課題が挙げられている。その一つが、遺伝子導入ベクターの問題である。従来のマウス心筋リプログラミング法では、レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターが遺伝子導入手段として用いられてきたが、感染した細胞のゲノム DNA にランダムに組み込まれ、DNA に損傷を与える危険性がある。そこで、我々の研究グループは GMT を同時に発現するセンダイウイルスベクターを作成した (Fig. 2)。センダイウイルスはレトロウイルスやレンチウイルスと違い細胞内でゲノム DNA に組み込まれないというメリットがある。実際に、マウス及びヒト線維芽細胞に心筋誘導センダイウイルスベクターを感染させたところ、短期間で効率よく心筋を誘導することに成功した<sup>29)</sup> (Fig. 2)。またセンダイウイルスベクターはレトロウイルスベクターに比べ、導入遺伝子のタンパク質発現効率が高いことが一因である可能性が示唆された。さらに、マウス心筋梗塞モデルにおいて、心筋誘導センダイウイルスベクターを心臓に直接投与すると、約 1 週間で梗塞部位において心筋が誘導され、1 か月後には線維化部位の減少及び心機能の改善を認めた<sup>29)</sup>。このように、安全かつ短期間で心筋誘導ができるセンダイウイルスベクターを用いてマウス急性心筋梗塞モデルにおける有効性を証明できたことは、着実に臨床応用に向けての課題を克服しつつあると言えるであろう。今後、慢性心不全などの別のマウスモデルでの検討を進めていきたいと考えている。



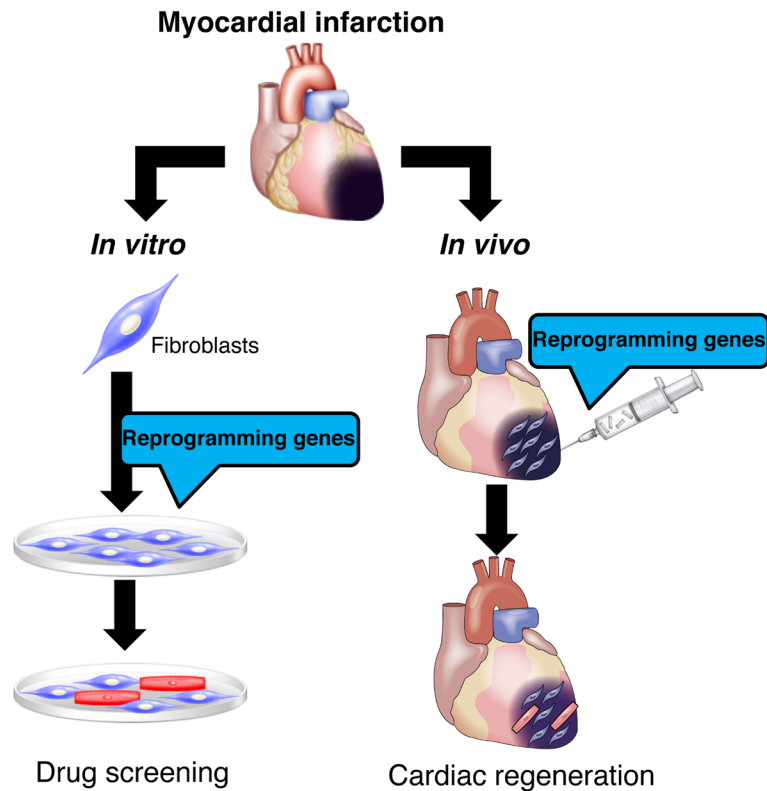


Fig. 3 *In vivo* cardiac regeneration therapy and *In vitro* application of induced cardiomyocytes (iCMs) by direct cardiac reprogramming

Injection of cardiac reprogramming cocktails induce the direct conversion of cardiac fibroblasts into iCMs *in situ* and could improve cardiac function. *In vitro* induced iCMs could be useful for the drug screening and discovery.

## おわりに

このように、国内外で非常に多くの基礎研究成果が積み上げられ、心筋ダイレクトリプログラミングは臨床応用に向けて着実に前進している (Fig. 3)。しかし先に挙げたように解決すべき課題が多く残されているのも事実である。今後はブタなどの大型動物モデルを用いた有効性・安全性の検証に加え、さらに効率的で容易なダイレクトリプログラミング法の開発が必須であろう (文献 14, Table 1, 2 参照)。そのためには、発生学や幹細胞生物学の知見や近年発展が著しいシングルセル解析やゲノム編集、さらには機械学習、材料工学等を用いた研究者の専門を超えた学際的な研究によって、さらなる発展が望まれる。今後のさらなるリプログラミング研究によって、心臓病患者へこの新しい治療法がいち早く届けられる日が来ることを期待している。

## 利益相反

著者の conflicts of interest (COI) 開示：特になし。

## 引用文献

- 1) Davis RL, Weintraub H, Lassar AB: Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1987; **51**: 987–1000
- 2) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; **126**: 663–676
- 3) Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, et al: Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 2010; **463**: 1035–1041
- 4) Ieda M, Fu J-D, Delgado-Olguin P, et al: Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010; **142**: 375–386
- 5) Zhou Y, Wang L, Liu Z, et al: Comparative gene expression analyses reveal distinct molecular signatures between differentially reprogrammed cardiomyocytes. *Cell Rep* 2017; **20**: 3014–3024
- 6) Inagawa K, Miyamoto K, Yamakawa H, et al: Induction of cardiomyocyte-like cells in infarct hearts by gene transfer of Gata4, Mef2c, and Tbx5. *Circ Res* 2012; **111**: 1147–1156
- 7) Qian L, Huang Y, Spencer CI, et al: In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature* 2012; **485**: 593–598
- 8) Song K, Nam Y-J, Luo X, et al: Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors.

- Nature 2012; **485**: 599–604
- 9) Wada R, Muraoka N, Inagawa K, et al: Induction of human cardiomyocyte-like cells from fibroblasts by defined factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**: 12667–12672
  - 10) Nam Y-J, Song K, Luo X, et al: Reprogramming of human fibroblasts toward a cardiac fate. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**: 5588–5593
  - 11) Fu J-D, Stone NR, Liu L, et al: Direct reprogramming of human fibroblasts toward a cardiomyocyte-like state. *Stem Cell Reports* 2013; **1**: 235–247
  - 12) Liu Z, Wang L, Welch JD, et al: Single-cell transcriptomics reconstructs fate conversion from fibroblast to cardiomyocyte. *Nature* 2017; **551**: 100–104
  - 13) Zhou Y, Liu Z, Welch JD, et al: Single-cell transcriptomic analyses of cell fate transitions during human cardiac reprogramming. *Cell Stem Cell* 2019; **25**: 149–164.e9
  - 14) Engel JL, Ardehali R: Direct cardiac reprogramming: progress and promise. *Stem Cells Int* 2018; **2018**: 1–10
  - 15) Jayawardena TM, Egemnazarov B, Finch EA, et al: MicroRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ Res* 2012; **110**: 1465–1473
  - 16) Muraoka N, Yamakawa H, Miyamoto K, et al: MiR-133 promotes cardiac reprogramming by directly repressing *Snai1* and silencing fibroblast signatures. *EMBO J* 2014; **33**: 1565–1581
  - 17) Zhao Y, Londono P, Cao Y, et al: High-efficiency reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes requires suppression of pro-fibrotic signalling. *Nat Commun* 2015; **6**: 8243
  - 18) Mohamed TMA, Stone NR, Berry EC, et al: Chemical enhancement of in vitro and in vivo direct cardiac reprogramming. *Circulation* 2017; **135**: 978–995
  - 19) Hashimoto H, Wang Z, Garry GA, et al: Cardiac reprogramming factors synergistically activate genome-wide cardiogenic stage-specific enhancers. *Cell Stem Cell* 2019; **25**: 69–86.e5
  - 20) Yamakawa H, Muraoka N, Miyamoto K, et al: Fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factor promote cardiac reprogramming under defined conditions. *Stem Cell Reports* 2015; **5**: 1128–1142
  - 21) Li Y, Dal-Pra S, Mirotsov M, et al: Tissue-engineered 3-dimensional (3D) microenvironment enhances the direct reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes by microRNAs. *Sci Rep* 2016; **6**: 38815
  - 22) Kurotsu S, Sadahiro T, Fujita R, et al: Soft matrix promotes cardiac reprogramming via inhibition of YAP/TAZ and suppression of fibroblast signatures. *Stem Cell Reports* 2020; **15**: 612–628
  - 23) Muraoka N, Nara K, Tamura F, et al: Role of cyclooxygenase-2-mediated prostaglandin E2-prostaglandin E receptor 4 signaling in cardiac reprogramming. *Nat Commun* 2019; **10**: 674
  - 24) Wang L, Liu Z, Yin C, et al: Stoichiometry of *Gata4*, *Mef2c*, and *Tbx5* influences the efficiency and quality of induced cardiac myocyte reprogramming. *Circ Res* 2015; **116**: 237–244
  - 25) Stone NR, Gifford CA, Thomas R, et al: Context-specific transcription factor functions regulate epigenomic and transcriptional dynamics during cardiac reprogramming. *Cell Stem Cell* 2019; **25**: 87–102.e9
  - 26) Fu Y, Huang C, Xu X, et al: Direct reprogramming of mouse fibroblasts into cardiomyocytes with chemical cocktails. *Cell Res* 2015; **25**: 1013–1024
  - 27) Cao N, Huang Y, Zheng J, et al: Conversion of human fibroblasts into functional cardiomyocytes by small molecules. *Science* 2016; **352**: 1216–1220
  - 28) Sadahiro T, Isomi M, Muraoka N, et al: *Tbx6* induces nascent mesoderm from pluripotent stem cells and temporally controls cardiac versus somite lineage diversification. *Cell Stem Cell* 2018; **23**: 382–395.e5
  - 29) Miyamoto K, Akiyama M, Tamura F, et al: Direct in vivo reprogramming with sendai virus vectors improves cardiac function after myocardial infarction. *Cell Stem Cell* 2018; **22**: 91–103.e5