

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム事業
(幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム)
事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 心臓再生のカギとなるヒト心筋細胞増殖制御機構の解析と増殖の実現
(英語) Study of human cardiomyocyte proliferation for cardiac regeneration

研究開発実施期間: 令和2年6月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 山下 潤
(英語) Jun K. YAMASHITA

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 東京大学・大学院医学系研究科・特任教授
(英語) Project Professor, Graduate School of Medicine, the University of Tokyo

II 研究開発の概要

[目的]

心臓再生は、「心筋細胞増殖の有無」により大きく規定されていると考えられ、心筋細胞増殖の達成は心臓再生達成の最重要課題である。ヒト心筋細胞の増殖停止様式はマウス心筋細胞と異なるため、ヒト細胞における研究が必要である。本研究ではヒト心筋細胞の増殖可能化を目的とし、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いてヒト心筋細胞増殖制御機構を解析した。ヒト心筋細胞の効率的増殖を可能とし心臓再生への応用研究を開始できるようにすることを目標とした。

[背景]

研究開発代表者は、ヒト多能性幹細胞を用いた心血管分化・再生研究を行い、独自の高効率・高収量の心筋分化誘導法を開発した。それを元に、ヒト心筋細胞の増殖活性を示す化合物をすでに複数同定している。これら増殖誘導化合物刺激時に、ヒト心筋細胞には増殖する細胞と増殖しない細胞がいることを見出した。単一細胞解析 (SCT) により両者の違いを解析し、ヒト心筋細胞を増殖可能化することにより、ヒト心筋細胞の高効率増殖が実現できると考えられた。

[研究開発項目とその内容]

1. ヒト心筋細胞の Single cell transcriptome (SCT) 解析。
増殖能消失細胞/増殖能残存細胞など種々の心筋細胞に増殖誘導化合物を投与し、RNA-seq 解析による mRNA 発現量をもとに SCT 解析した。さらに東京大学のスーパーコンピュータを用い、遺伝子相互関係に関する解析を加え探索を行った。
2. 増殖心筋特異的分子の同定：
化合物投与に反応し増殖障壁を越えた細胞群に特異的な遺伝子として分子 A を同定。逆に増殖刺激に反応しない細胞における増殖抑制遺伝子候補群を同定した。
3. 心筋細胞増殖を制御する分子の同定：2. で同定した分子の機能解析
CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子阻害実験系を構築した。分子 A に関しては、増殖可能心筋における発現を確認し、分子 A 発現心筋は高い増殖能を有し (Responder 心筋である)、3 倍増の増殖をしようする結果を得た (最終目標ほぼ到達)。
4. 同分子を用いたヒト心筋細胞増殖の達成：心筋細胞の Responder 化と高効率増殖。
心筋細胞における分子 A 発現機構の解析、分子 A の強制発現による効果を検討している。
5. 新規ヒト心臓再生治療戦略の開発：細胞外小胞を用いた治療戦略開発研究に着手した。

[考察]

本研究は循環器学や細胞生物学の長年に渡る悲願でありながら決定的な結果を得るには至っていない「ヒト心筋細胞の増殖」を実現し、それを元に将来的にはヒトの心臓そのものを再生可能に改変することにより心筋梗塞などによる死亡を回避する画期的治療につなげることを主題とする研究であり、まさに「幹細胞・再生医学イノベーション創出」というプログラムに相応しい内容と考えている。しかしそれは当然簡単には達成できるものではなく、種々の先進的取り組みが複合されることが必要であった。すなわち、

- ① ヒトの心室筋細胞を簡便に圧倒的純度の高さに潤沢に調製できるヒト iPS 細胞分化誘導技術
- ② ヒトの心筋細胞増殖を恣意的に誘導できる培養条件 (独自に増殖誘導化合物を同定)
- ③ 種々のステージの細胞が混在していても解析が可能な SCT 解析
というアドバンテージを活かした新たな解析を行い、従来報告されていた遺伝子群の検出などを確認しながら Valid な解析を進められたこと。さらに、
- ④ 候補遺伝子絞り込みのための新しい解析。遺伝子発現量だけでなくネットワーク解析ができる新技法。
- ⑤ 爆発的に大きな情報量に対処できるスーパーコンピュータ
が新たに加わることにより、ヒト心筋細胞を増殖可能とすることにほぼ手が届くところまで研究を進めることができた。

[成果の価値]

マウスやヒト成体の心筋細胞が増殖しないことは 20 世紀初頭頃には知られており、心筋細胞を細胞周期遺伝子の強制発現などにより何とか増殖させようとする試みは 20 世紀終わり頃から認められる (Soonpaa, J Clin Invest, 1997)。しかし現在でもどの程度の心筋細胞の分裂が達成できているのかは明確に示されていない (Gerbern & Lee, Dev Cell, 2022)。また、マウス心筋細胞で増殖誘導活性があったようなものでも、ヒト心筋細胞ではその効果が明らかでないものも多い。本研究は、独自に確立したヒト心筋細胞誘導法、ヒト心筋細胞増殖誘導化合物を基本的材料とし、まったく増殖活性を失っ

ている 200 日以上培養ヒト心筋細胞も用いて、ヒト心筋細胞が増殖抵抗状態から増殖中に至るまでの各段階を用意し、single cell レベルで RNA 発現比較する、さらには遺伝子ネットワークの解析を全遺伝子レベルで行う、という恐らく世界的にも先進的な研究スキームにより、その機構解明を図っているものである。ヒト心筋細胞の Responder 化と高効率増殖が誘導できれば、それは数十年以上に渡る心筋細胞増殖研究において最大級のエポックメイキングな技術的進歩である。

心臓は傷害後に再生しない臓器として知られ、心臓の再生は再生医療の最重要ターゲットの一つである。実際、心疾患は日本人死因の第 2 位、アメリカでは 1 位であり、ヒト心臓が再生可能となることの社会的インパクトは非常に大きい。心臓再生の試みの中で最近注目されているのが心筋細胞の増殖能である。心筋細胞が増殖能を有しているゼブラフィッシュやマウス胎仔、ブタ胎仔などでは心臓傷害後も心臓が再生する。心筋細胞増殖能が失われるにしたがって、傷害後の心臓再生能もなくなる。したがって、ヒト心筋細胞の増殖達成はヒト心臓再生に直結すると考えられている (Vujic, Semin Cell Dev Biol, 2019)。本研究課題が将来的に達成したいと考える心臓再生スキームは、「薬剤等の投与など低侵襲で簡便な方法で、一過性に生体内のヒト心筋細胞を増殖可能とし、心筋梗塞などの傷害時に心臓を再生可能にして危険を回避できるようにする」ことであり、現在の「開胸手術による心筋細胞の移植」といういわばプリミティブな心臓再生治療から数段階進んだ低侵襲で汎用性の高い心臓再生治療である。その実現がもたらす社会的価値は計り知れない。

[今後の展望]

1. 分子 A に関して、分子 A の発現誘導により心筋細胞の Responder 化が可能かを検討。分子 A の発現誘導機構の解析。分子 A の下流シグナルの解析を行い、心筋細胞の増殖制御機構を明らかにする。
2. 分子 A 以外の候補分子に関しても同様に、機能解析から Responder 化への関与を検討し、心筋の増殖制御機構の解明を進める。

これらの研究により、ヒト心筋細胞の高効率の増殖誘導を実現し、心筋細胞の増殖制御研究におけるハイインパクトな知見を提供する。

3. 細胞外小胞 (EV) を用いた治療戦略の開発。分子 A 過剰発現細胞由来の EV を用いて心筋細胞の Responder 化ができるか検討する。生体への投与における効果を検討し、投与量や方法、心筋へのターゲティングなど必要とされる技術を抽出、開発する。
4. 同定した候補分子群を制御し心筋の Responder 化を誘導できる化合物スクリーニングを行う。投薬による心臓再生治療を可能にする。

これらの展開により、新しい心臓再生治療法を開拓する。再生医学の一端を支える新規産業となるような大きな発展が期待される。

[Purpose] Cardiac regeneration is believed to be largely determined by the presence or absence of cardiomyocyte proliferation, and achieving cardiomyocyte proliferation is the most important challenge in achieving cardiac regeneration. Since the cessation mechanism of proliferation in human cardiomyocytes is considered to be different from that in mouse ones, research in human cells is necessary. In this study, we aimed to enable the proliferation of human cardiomyocytes and analyzed the mechanism of cardiomyocyte proliferation control using human induced pluripotent stem cell (hiPSCs)-derived cardiomyocytes. Our goal is to enable efficient proliferation of human cardiomyocytes and start applied research for cardiac regeneration.

[Backgrounds] The research and development representative and colleagues have been conducting

cardiovascular differentiation and regeneration research using human pluripotent stem cells, and developed a unique and highly efficient method for inducing cardiomyocyte differentiation. Based on the methods, several compounds that demonstrate proliferative activity in human cardiomyocytes have already been identified. During the stimulation with these proliferation-inducing compounds, it was discovered that there are both proliferating (Responders) and non-proliferating cells (non-responders) in human cardiomyocytes. By analyzing the differences between them using single-cell analysis (SCT), it is believed that efficient proliferation of human cardiomyocytes can be achieved through changing human cardiomyocytes proliferative Responders.

[Research Projects and their Contents]

1. Single Cell Transcriptome (SCT) analysis of Human Cardiomyocytes:

The SCT analysis was performed based on the mRNA expression levels obtained from RNA-seq analysis, where various cardiomyocytes including cells with impaired proliferation ability and cells with preserved proliferation ability were treated with proliferation-inducing compounds. In addition, analysis on gene-to-gene interactions was conducted using the supercomputer at the University of Tokyo to further explore the findings.

2. Identification of Cardiac Proliferation-Specific Molecules:

One candidate molecule A was identified as a gene specific to the group of cells that responded to compound treatment and overcame the proliferation barrier. Conversely, a group of candidate genes related to proliferation inhibition was identified in cells that did not respond to proliferation stimuli.

3. Identification of Molecules that Regulate Cardiomyocyte Proliferation:

Functional analysis of the molecules identified in step 2 was conducted by constructing a gene loss-of-function experimental system using CRISPR/Cas9. Regarding molecule A, the expression in proliferative cardiomyocytes was confirmed, and it was found that cardiomyocytes expressing molecule A (Responder cells) exhibited a high proliferation ability, resulting in a three-fold increase in proliferation (almost reaching the final goal).

4. Achievement of Human Cardiomyocyte Proliferation using the Identified Molecule:

The mechanism of molecule A expression in cardiomyocytes and the effects of forced expression of molecule A are being investigated.

5. Development of Novel Human Cardiac Regeneration Therapeutic Strategy:

Novel research on the development of therapeutic strategies using extracellular vesicles has been initiated.