

日本医療研究開発機構
再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム
再生・細胞医療・遺伝子治療研究開発課題（基礎応用研究課題）
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）ダイレクトリプログラミングによる革新的心臓再生遺伝子治療の開発
（英語）Direct reprogramming and gene therapy for cardiac regeneration

研究開発実施期間：令和 4 年 7 月 25 日～令和 7 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：（日本語）家田 真樹
（英語）Masaki Ieda

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語）学校法人慶應義塾大学・医学部・教授
（英語）Department of Cardiology, Keio University School of Medicine, Professor

II 研究開発の概要

背景

心不全に対する再生医療が期待されている。一方、近年の研究で心不全の半数は、心臓線維化と左室拡張障害による収縮能の保たれた心不全（heart failure with preserved ejection fraction, HFpEF）と報告されているが、有効な治療法がなく新しい治療開発が求められている。幹細胞から心筋を作製して移植する心臓再生法があるが、腫瘍形成の可能性、組織への低生着、線維化や HFpEF に無効など課題がある。我々はこれに対して線維芽細胞を心筋にダイレクトリプログラミングする技術を開発し、心臓再生と同時に線維化改善が可能になった。しかし臨床応用には生体に安全に使用できる心筋リプログラミングベクターが必要であり、また現状では HFpEF に対する心筋リプログラミングの有効性は不明であり、本研究ではこれらの課題を解決する。

我々はこれまでに心筋リプログラミング遺伝子 Gata4, Mef2c, Tbx5 を発見し、センダイウイルスベクターによる心筋リプログラミングでマウス心筋梗塞の心臓再生に成功するなど本領域を先導してきた (Ieda et al, Cell 2010, Miyamoto et al, Cell Stem Cell 2018, Isomi et al, Circulation 2021)。しかしセンダイウイルスベクターは免疫原性を有するため、臨床応用には安全性の高い心臓線維芽細胞特異的に遺伝子発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの開発が必要である。また臨床で問題となっている HFpEF に心筋リプログラ

ミングが有効かは不明である。そこで本研究では、心筋リプログラミングに最適な新規 AAV ベクターを開発し、心筋梗塞後心不全に対する心臓再生遺伝子治療を確立する。さらに HFpEF に対する心筋リプログラミングの有効性を検証し、その分子機構を解明する。

方法と結果

1. 心筋リプログラミング AAV ベクターの開発と心臓再生遺伝子治療への応用

(1) 新規心臓線維芽細胞特異的 AAV ベクターの開発

AAV ベクターにはさまざまな血清型が存在し、各血清型により細胞や組織への感染特異性が異なるため、心臓線維芽細胞に効率よく遺伝子導入できる血清型を同定するため、11 種類の異なる血清型の AAV-CMV-GFP ベクター (AAV1~10, DJ) を作製した。その中で心臓線維芽細胞に指向性と発現が高い血清型を、心臓線維芽細胞と心筋細胞を用いた *in vitro* 実験およびマウス *in vivo* 実験で FACS や免疫染色などを用いて同定した。その結果、*in vitro* 実験では、AAV1, 6, DJ が心臓線維芽細胞で高発現が認められた。一方、マウス心筋梗塞モデルを用いた *in vivo* 実験では、AAV-CMV-GFP ベクター (AAV1~10, DJ) のすべての血清型で、心筋細胞に親和性が高いことが認められた。この結果は AAV の発現は *in vitro* と *in vivo* で異なることがあるという過去の報告と一致していた。そこで、我々は次にプロモーターを CMV から線維芽細胞特異的遺伝子である *Postn* に変えて *in vivo* 実験を行った。血清型としては *in vitro* で心臓線維芽細胞で高発現を示した血清型 AAV6, DJ と *in vivo* 心臓で高発現することが知られる AAV9 を用いて、AAV-*Postn*-Cre を作製して、Tomato レポーターマウスの心筋梗塞モデルで *in vivo* 実験を行った。その結果、AAV-DJ-*Postn* が他の血清型と比べて、心臓線維芽細胞で高発現することが明らかになった。以上より AAV の血清型とプロモーターを心臓線維芽細胞用に最適化することで、新規心臓線維芽細胞特異的 AAV ベクターである AAV-DJ-*Postn* の開発に成功した。

(2) 心筋リプログラミング AAV ベクターによる急性心筋梗塞の心臓再生

次に AAV による心筋リプログラミングを改善するため、心筋リプログラミング因子である *Mef2c* の転写活性を強化するベクターを開発した。*Mef2c* の c 末に *Myod* の transactivation domain (*Myod*-TAD) を付加した活性化 *Mef2c* ベクター *Mef2c*-M3 により、*in vitro* で心筋リプログラミング効率改善に成功し、論文発表を行った (Kojima et al, *Stem Cell Reports* 2023)。次に活性化 *Mef2c* ベクター *Mef2c*-M3 の AAV ベクターによる *in vivo* 心筋リプログラミング効果を明らかにするため、AAV-DJ-*Postn*-*Gata4*/*Hand2*/*Tbx5*/*Mef2c* に加えて *Mef2c*-M3 ベクターを作製した。急性心筋梗塞モデルでの心筋リプログラミング効率を明らかにするため、線維芽細胞リネージトレースマウス (*Postn*-*ERC*Cre/*Tomato* マウス) を用いて、冠動脈結紮により心筋梗塞を作成し、AAV ベクターを梗塞部局所に投与して心筋リプログラミングと心臓再生を確認した。AAV-DJ-*Postn*-*Gata4*/*Hand2*/*Tbx5*/*Mef2c* (GHT/M) と *Gata4*/*Hand2*/*Tbx5*/*Mef2c*-M3 (GHT/M3) を局所投与したところ、AAV-DJ-*Postn*-GHT/M3 群で約 2% の心筋リプログラミングが見られた。また AAV-DJ-*Postn*-GHT/M3 では AAV-DJ-*Postn*-GHT/M と比較して、心筋リプログラミング効率が約 2 倍に改善した。さらに別の心臓線維芽細胞リネージトレースマウス (*Tcf21*iCre/*Tomato* マウス) でも AAV-DJ-*Postn*-GHT/M3 により急性心筋梗塞で生体内心筋リプログラミングを確認した。

(3) 心筋リプログラミング AAV ベクターによる心筋梗塞慢性期の心臓再生と機序解明

次に AAV-DJ-*Postn*-GHT/M3 による生体内心筋リプログラミングの有効性と安全性を心筋梗塞の慢性期に解析した。心筋梗塞 1 か月後に心エコーで心機能を解析したところ、AAV-DJ-*Postn*-GHT/M3 治療群ではコントロール群と比べて左室駆出率である LVEF が 10% 改善した。また病理組織学的解析では、心臓線維化 (梗塞面積) が有意に減少し、逆に心筋組織面積の増加を認めた。次にその分子メカニズムを解明するため RNAseq 解析を行った。AAV-DJ-*Postn*-GHT/M3 治療群ではコントロール群と比較して 733 遺伝子が上昇し、2992 遺伝子が低下すること、GO term 解析で発現上昇遺伝子群に心筋関連遺伝子が多く含まれるのに対して、抑制遺伝子群には線維化や炎症関連遺伝子が多く含まれることを明らかにした。Heatmap 解析では *Tnni3* など心筋線維に関係する遺伝子上昇に対して、*Tgfb*, *Col3a1*, *Comp*, *Ccr2*, *Il6r* や *Nppa* など心臓線維化、炎症、心不全マーカーの低下が確認された。また治療の安全性としては、心臓以外の他臓器でリプログラミング遺伝子が発現しないこと、さらに心筋リプロ

ラミングも起きないことを確認した。以上より、AAV-DJ-Postn-GHT/M3 による心筋リプログラミング遺伝子再生治療が心筋梗塞後心不全を改善することを明らかにし、論文発表と特許出願を行った (Nakano et al, Stem Cell Reports 2024, 特願 2024-107728)。

2. HFpEF に対する心筋リプログラミングと機序解明

(1)心筋リプログラミング遺伝子発現 HFpEF モデルマウスの開発

我々はこれまでに心筋リプログラミングが心臓再生に加えて強力な抗線維化作用を有することを心筋梗塞モデルで見出しており、この知見を拡張障害や線維化を病態の特徴とする HFpEF モデルに応用した。HFpEF モデルの心臓線維芽細胞で心筋リプログラミング遺伝子発現を誘導するため、タモキシフェン投与により線維芽細胞で時期特異的に心筋リプログラミング遺伝子発現を制御できる遺伝子改変マウスを作製した。方法としては心筋リプログラミング遺伝子 Mef2c/Gata4/Tbx5/Hand2 (MGTH) 発現 flox マウス (CAG-CAT-MGTH2A)、線維芽細胞特異的 ER-Cre マウス (Tcf21-iCre)、レポーターマウス (R26-tdTomato) を交配して、トリプル TG マウス (TTg マウス) を作製した。まず TTg マウスをこれまで実績の多い心筋梗塞モデルで検証したところ、心臓線維芽細胞で心筋リプログラミング遺伝子が発現すること、生体内で心筋リプログラミング可能なことを確認して、論文発表を行った (Tani et al., Circulation, 2023)。次に、TTg マウスに L-NAME と High Fat Diet (HFD)を与えて HFpEF モデルを作製した (Schiattarella et al., Nature 2019)。L-NAME/HFD 投与 5 週後に、既報通りに血圧や体重の増加、心エコーで左室拡張障害と心不全、病理で心臓線維化を確認し、心筋リプログラミング遺伝子発現 HFpEF モデル作製に成功した。

(2) 心筋リプログラミングによる HFpEF の改善

次に心筋リプログラミング遺伝子発現マウスに L-NAME/HFD 投与 5 週後の HFpEF モデル完成後にタモキシフェンを投与して、心筋リプログラミングを誘導した。その結果、心臓線維芽細胞で心筋リプログラミング遺伝子 MGTH を発現することで、1%の心筋リプログラミングに加えて、左室線維化改善、心エコーで左室拡張障害改善、心臓カテーテル検査で LVEDP 低下など心不全の改善を認めた。またトレッドミル検査では歩行距離が延長し、運動機能改善を認めた。さらに HFpEF に伴う心肥大や毛細血管減少も改善を認め、心筋リプログラミングにより HFpEF が改善することを明らかにした。

(3) 心筋リプログラミングの作用機序解明

心臓内には心筋細胞や線維芽細胞以外に、免疫細胞、血管内皮細胞なども存在し心機能に影響を及ぼす。HFpEF に対する心筋リプログラミングの作用機序を解明するため、上記遺伝子改変マウスの HFpEF 心臓細胞に対して Single cell RNA-seq、細胞間ネットワーク解析、ATAC-seq、Visium 空間的遺伝子発現解析などを行った。シングルセル解析の結果、心臓線維芽細胞は 6 種類に分かれること、また心臓線維芽細胞が中心となって、免疫細胞、血管内皮細胞など様々な心臓細胞に作用を及ぼしていることが明らかになった。さらに空間的遺伝子発現解析により、心臓線維芽細胞は Postn など発現する血管周囲型の線維芽細胞と間質に存在する線維芽細胞に分かれることを確認した。興味深いことに心筋リプログラミングはどちらのタイプの心臓線維芽細胞にも影響を及ぼし、心臓全体で抗線維化に働くことを解明した。

(4) Gata4 一因子発現による HFpEF 改善と分子機序解明

HFpEF の病態は線維化と拡張障害であり、左室収縮能は保たれているため、心筋リプログラミングによる抗線維化がメインの作用機序の可能性がある。そこで、心筋リプログラミング遺伝子 Mef2c, Gata4, Tbx5, Hand2 のどの因子が HFpEF 改善に効果があるか検討した。Mef2c, Gata4, Tbx5, Hand2 の各 1 因子を発現する flox マウスを作製して (SF-Gata4 など)、同線維芽細胞に pMX-Cre を導入した。その結果、各 4 因子発現細胞の中で、Gata4 一因子発現により強く線維化関連遺伝子の低下がみられ、一方心筋は予想通り誘導されなかった。そこで、Gata4 と Mef2c 各一因子を心臓線維芽細胞で過剰発現するマウスを作製し、HFpEF モデルに対する効果を検討した。その結果、心臓線維芽細胞で Gata4 一因子発現のみで線維化改善や左室拡張障害の改善など、HFpEF 心不全の改善を認めた。また ChIP-seq data の解析により、Gata4 が線維化マスター遺伝子である Meox1 の調節領域に直接結合し

て、エピジェネティック変化を介して線維化関連遺伝子の発現を低下させることを明らかにした。
次にヒト心臓線維芽細胞でも **Gata4** の抗線維化作用を解析した。TGF β で活性化したヒト心臓線維芽細胞に対して **Gata4** 一因子を過剰発現することで、線維化関連遺伝子の低下と線維化活性化マーカー(α SMA)の低下が認められた。以上より、心臓線維芽細胞で **Gata4** 一因子発現により HFpEF が改善すること、さらにその分子機構を明らかにして、論文発表と特許出願を行った (Yamada et al., Circulation, 2025, PCT/JP2024/000151)。

考察

本研究により、ダイレクトリプログラミングによる革新的心臓再生遺伝子治療の臨床応用が大きく前進した。これまで存在しなかった新規心臓線維芽細胞特異的 AAV ベクターを開発して、心筋梗塞後心不全に対する有効で安全な心筋リプログラミング AAV ベクターの作製に成功した。また HFpEF に対する有効性を確立して、本治療法は心筋再生に加えて抗線維化作用を併せ持ち、従来の細胞移植法にはない新しい強みがあり、今後大いに発展が期待できる。

Background

Regenerative medicine is a promising approach for treating heart failure. Approximately half of heart failure cases are classified as heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF), which is characterized by cardiac fibrosis and diastolic dysfunction, and currently lacks effective treatments. Although regenerative strategies involving stem cell-derived cardiomyocyte transplantation have been attempted, they face issues like tumorigenicity, low engraftment, and ineffectiveness against fibrosis and HFpEF. To address these limitations, the authors developed a direct cardiac reprogramming technique that converts fibroblasts into cardiomyocytes, achieving both cardiac regeneration and anti-fibrotic effects. However, for clinical translation, a safe and specific gene delivery system is needed, and the efficacy of this approach in HFpEF remains unknown.

Methods and Results

(1) Development of a Cardiac Reprogramming AAV Vector and Its Application in Cardiac Regenerative Gene Therapy

In this study, we screened AAV serotypes and promoters with high specificity toward cardiac fibroblasts and successfully identified a novel fibroblast-specific vector, AAV-DJ-Postn. Furthermore, we developed AAV-DJ-Postn-GHTM3, a vector that expresses cardiac reprogramming genes (Kojima et al., *Stem Cell Reports*, 2023). In a mouse model of myocardial infarction, in vivo gene therapy using this vector successfully induced direct cardiac reprogramming, resulting in improved cardiac function and reduction of infarct size. These findings demonstrate the successful development of a cardiac reprogramming AAV vector and its therapeutic efficacy in cardiac regeneration, which led to both a peer-reviewed publication and a patent application (Nakano et al., *Stem Cell Reports*, 2024; Japanese Patent Application No. 2024-107728).

(2) Cardiac Reprogramming for HFpEF and Mechanistic Elucidation

We developed genetically engineered mice in which cardiac reprogramming gene expression can be temporally and cell-specifically regulated, and applied this system to a mouse model of HFpEF. As a result, direct cardiac reprogramming led to reduced cardiac fibrosis and improvement of HFpEF-related phenotypes. Single-cell transcriptomics and spatial transcriptomic analyses revealed that reprogramming induced anti-fibrotic effects in both perivascular and interstitial cardiac fibroblast populations. Furthermore, we demonstrated that expression of the single factor Gata4 was sufficient to improve HFpEF. Mechanistically, Gata4 was shown to directly suppress the expression of Meox1, a master regulator of fibrosis, thereby downregulating fibrosis-related genes. Collectively, these results establish the therapeutic efficacy and clarify the mechanism of cardiac reprogramming in HFpEF, resulting in a publication and international patent application (Yamada et al., *Circulation*, 2025; PCT/JP2024/000151).

Conclusions

This study significantly advances clinical translation of cardiac direct reprogramming as a gene therapy for heart failure. The newly developed AAV-DJ-Postn vector enables safe and targeted delivery to cardiac fibroblasts. The therapy demonstrated effectiveness in both post-MI and HFpEF models, combining myocardial regeneration with anti-fibrotic effects, offering a unique advantage over traditional cell therapies. These findings led to peer-reviewed publications and patent filings, supporting future therapeutic development.