

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：心機能再生を目指した特定因子による細胞変換技術
2. 研究開発代表者：竹内 純（東京大学分子細胞生物学研究所）
3. 研究開発の成果：サイトカイン無添加での心筋誘導法開発とペースメーカー細胞の樹立

本研究チームは特定因子を活用して、細胞（心筋およびペースメーカー）の分化を制御することを目標とする。本研究開発で得られた技術を拠点 A・ハイウェイおよび創薬開発事業へ展開させる。

### ●研究項目 1：ヒト型機能性心筋細胞（および心室筋）の樹立

\* 2 因子による心臓誘導技術開発：心臓誘導に重要な新規 SALL1 遺伝子に関する心臓誘導技術開発については 2015 年 9 月に特許申請を行った（特願 2015-187363）。また、2016 年 2 月に本研究結果を国際科学雑誌に報告した（Morita et al., JMCC 2016:当該月号の表紙に選出）。さらに、SALL1 と協調的に機能する因子を見出し、本年度研究開発として 2 つの因子が心臓誘導に深く関わることを発見した。

\* サイトカイン無添加による心臓誘導法の開発：心臓誘導には様々なサイトカインの投与が必要であり、その中で主要 3 つのサイトカイン（アクチビン（中胚葉誘導）、WNT インヒビター（心臓誘導）、VEGF（心血管誘導））は心臓中胚葉から心筋誘導には欠かせないものであり、適切な投与により格段と誘導効率が上がると報告されている。しかしながら、これらのサイトカインは値段も高く、 $1 \times 10^9$  個の心筋（一般的なヒト心筋シート作製に必要な細胞数）を誘導する為に必要な WNT インヒビターは大凡 100 万円程度経費がかかる。また、シスト形成率（中胚葉誘導能にばらつき）が高く、神経分化や内胚葉分化を誘導してしまう。本チームは上記 2 つの特定因子を一過的に強制発現させることで、99%の細胞が心臓に誘導されていることを見出していた。①アクチビン投与により中胚葉誘導後に DKK1 と VEGF 無添加条件での特定 2 因子一過的誘導による心筋誘導可否実験を行ったところ、心筋遺伝子の発現亢進が認められ、拍動した機能性心筋の誘導が認められた。②アクチビンも含めた主要 3 つのサイトカイン無添加条件での 2 因子の一過的強制発現系においても、心トロポニン遺伝子および 2 型ミオシン軽鎖遺伝子誘導能は維持されていた。興味深いことに、遺伝子発現解析によって、神経分化主要遺伝子のみならず中胚葉性由来の骨格筋誘導・分化に関わる重要な遺伝子群の発現が抑制されていたことから、上記 2 因子が協調的に作用することによって中胚葉因子の中で心臓関連遺伝子を正に制御し、他の中胚葉遺伝子を負に制御していると考えられる（Morita et al., in preparation・特許申請）。

本研究結果でこれらのサイトカインが不要となることは臨床研究において大きな意味を持つと考えられ、現在、他研究機関への技術移転中である。

\* 移植可能な心筋樹立：医療分野の進展に寄与する可能性を広げるべく、心筋梗塞モデルマウスを用いて誘導心筋細胞の移植を以下のように行った。TG 群 4 匹、対照群 3 匹に対してそれぞれ純化心筋細胞  $1 \times 10^6$  個の移植を行った（分担研究機関：京都大学チーム）。高効率での心筋細胞分化や、心筋梗塞モデル動物に十分な心筋細胞を作製し移植を行うことは、心筋細胞移植治療の開発の上で重要な意義を持つ。誘導細胞は分化誘導後 10 日で再播種すると効率良く心筋シート構造を形成した。

### ●研究項目 2：ペースメーカー細胞へのプログラム化

\* マウス型ペースメーカー細胞の樹立：ペースメーカー誘導候補因子を mES・hiPS 細胞株で強制発現させるコンストラクトを作製した（京大チーム）。14%程度の陽性細胞が得られ、HCN4/SCN5a/ Gja5/Tbx5 陽性かつ Nkx2-5 陰性のペースメーカー様細胞へと分化した（東大・竹内）。

\* ヒト型ペースメーカー細胞の樹立：候補遺伝子を一過的に発現させることができる DOX 誘導発現 piggyBac ベクターを用いた強制発現 TG-iPS 細胞の作製を試みている。ペースメーカー細胞特異的な細胞表面現に存在するイオンチャネルの発現を擁する細胞株を誘導出来ていることから、条件を整えることで機能性細胞を作製することが可能であると考えている。