

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業  
(英語) Practical Research Project for Rare/Intractable Diseases
- 研究開発課題名： (日本語) 心臓線維芽細胞をターゲットとする心筋再生遺伝子治療薬の開発  
(英語) Development of gene therapy targeting cardiac fibroblasts for heart regeneration
- 研究開発担当者 (日本語) 慶應義塾大学医学部内科学教室 (循環器) 専任講師 家田真樹  
所属 役職 氏名： (英語) Department of Cardiology, Keio University School of Medicine, Associate Professor, Masaki Ieda
- 実施期間： 平成 28 年 11 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) AAV ベクターの開発・作製  
開発課題名： (英語) Development and manufacture of AAV vector
- 研究開発分担者 (日本語) 自治医科大学分子病態治療研究センター 教授 水上浩明  
所属 役職 氏名： (英語) Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University, Professor, Hiroaki Mizukami
- 分担研究 (日本語) F/HN-SIV ベクターの開発・製造  
開発課題名： (英語) Development and manufacture of F/HN-SIV vector
- 研究開発分担者 (日本語) 株式会社 ID ファーマ事業本部 常務執行役員 井上誠  
所属 役職 氏名： (英語) ID Pharma DNAVEC Center, Director, Makoto Inoue

## II. 成果の概要（総括研究報告）

心臓移植を要する心不全患者の約半数を占める拡張型心筋症は原因不明の心筋収縮力低下と心臓線維化を特徴とする予後不良の難病である。これまでに、線維化の原因となる心臓線維芽細胞をターゲットとするベクターはなく、現在のところ線維化病変に対する治療薬はない。また重症心不全に対する根治的治療として再生医療が期待されている。我々は心筋特異的な3つの転写因子(Gata4, Mef2c, Tbx5)が心筋リプログラミング因子であることを世界で初めて発見し、さらに生体内に同遺伝子をレトロウイルスベクターで導入して心臓線維芽細胞を直接心筋細胞へリプログラミングして心臓再生できることを報告した(Ieda et al, Cell, 2010, Inagawa et al, Circ Res, 2012, Wada et al, PNAS 2013, Muraoka et al, EMBO J 2014, Sadahiro et al. Circ Res 2015)。心筋リプログラミングによる再生医療実現には心臓線維芽細胞で安全かつ効率的に発現する遺伝子ベクターの開発が急務である。そこで本研究では心臓線維芽細胞を心筋細胞に分化転換する心筋リプログラミング因子搭載 AAV ベクターとレンチウイルスベクターを開発し、革新的な心筋再生遺伝子治療薬を開発することを目的とする。本年度は心臓線維芽細胞に特異的に感染するベクターおよびプロモーターを同定した。

### 1. 心臓線維芽細胞に感染するベクターの同定

我々は心臓線維芽細胞に感染するベクターを作成するため、1. 培養細胞を用いた *in vitro* の検討、2. マウス心筋梗塞モデルに GFP 遺伝子導入、3. 心臓線維芽細胞特異的プロモーターの同定を行った。これまでに本年度の実験で心臓線維芽細胞に効率的に感染する AAV ベクター、レンチウイルスベクターを同定し、さらに心臓線維芽細胞特異的発現を示すプロモーター領域の同定に成功した。

#### (1) 培養心臓線維芽細胞と心筋細胞を用いたベクターのスクリーニング

ウイルスベクターは外膜蛋白の構成により細胞や組織への感染特異性がある。*in vitro* の培養細胞実験でラット培養心臓線維芽細胞と心筋細胞を用いて、線維芽細胞に感染しやすいベクターをスクリーニングした。AAV ベクターは 10 種類の血清型で感染特異性を比較し、そのほかに F/HN-SIV や VSVG-HIV レンチウイルスベクターを使用した。本年度の実験で心臓線維芽細胞に親和性の高い AAV ベクターの血清型 X (AAV-X) を同定でき、さらにレンチウイルスベクターが心臓線維芽細胞特異的であることを見出した。

#### (2) マウス心筋梗塞モデルにおける遺伝子発現の確認

ヒトと同じ拡張型心筋症のモデルマウスが存在しないため、本研究では心不全・線維化モデルとして頻用される心筋梗塞モデルを用いた。拡張型心筋症と心筋梗塞の心臓線維芽細胞は同じ origin であり、性質も類似していることから代用可能である。上記 *in vitro* の実験で同定した AAV-X とレンチウイルスベクターの GFP 発現ベクターを大量作製して、マウス心筋梗塞モデルに遺伝子導入して *in vivo* で心臓線維芽細胞への感染特異性を確認した。これまでの実験で、マウス心臓に直接投与したところ、梗塞部線維化組織の心臓線維芽細胞で GFP が発現し、健常部心筋細胞では GFP を発現しないことを見出した。

#### (3) 心臓線維芽細胞特異的発現を示すプロモーター領域の同定

遺伝子治療ベクターの心臓線維芽細胞特異性をさらに向上するため、線維芽細胞特異的プロモーターを同定した。線維芽細胞特異的に発現する遺伝子の情報やバイオインフォマティクスなどから複数の Luciferase ベクターを作製し、Luciferase assay で最適なプロモーター領域を決定した。

Luciferase assay を培養心臓線維芽細胞と心筋細胞で比較し、心臓線維芽細胞特異的なプロモーターを同定できた。

## Results

Dilated cardiomyopathy (DCM) is a rare disease with poor prognosis. Hearts of patients with DCM show systolic dysfunction, cardiac fibrosis, and heart failure; therefore, the ultimate and only therapy for DCM is heart transplantation. Regenerative therapy has received attention as a new treatment for severe heart failure. Moreover, there are no effective therapies/drugs for cardiac fibrosis, and no vectors targeting cardiac fibroblasts have been identified. We first reported that the cardiac-specific transcription factors—Gata4, Mef2c, and Tbx5—reprogrammed cardiac fibroblasts into induced cardiomyocyte-like cells (iCMs) *in vitro* and *in vivo*. Moreover, *in vivo* cardiac reprogramming using retroviral vectors regenerated infarct hearts and improved cardiac function (Ieda et al, Cell, 2010, Inagawa et al, Circ Res, 2012, Wada et al, PNAS 2013, Muraoka et al, EMBO J 2014). To translate this new regenerative technology to the clinical setting, it is necessary to develop new vectors expressing transgenes efficiently and safely in cardiac fibroblasts. In this study, we will develop a novel gene therapy using adeno-associated virus (AAV) and lentivirus vectors, which express cardiac reprogramming factors that convert cardiac fibroblasts into iCMs. Specifically, this year, we developed vectors and promoters that specifically express transgenes in cardiac fibroblasts.

### **1. Identification of vectors expressing transgenes specifically in cardiac fibroblasts**

To develop vectors expressing transgenes specifically in cardiac fibroblasts, we performed the following experiments: (1) *in vitro* screening using primary cultured cardiac fibroblasts, (2) *in vivo* screening using a mouse myocardial infarction model, and (3) identification of cardiac fibroblast-specific promoter sequences. This year, we analyzed AAV and lentivirus vectors for infection of cardiac fibroblasts and identified the cardiac fibroblast-specific promoter.

#### **(1) In vitro screening using primary cultured cardiac fibroblasts and cardiomyocytes**

Viral vectors preferentially infect specific cell types and tissues depending on the composition of viral capsids. We screened for vectors expressing transgenes using rat primary cultured cardiac fibroblasts and cardiomyocytes *in vitro*. We analyzed 10 different serum types of AAV vectors and lentivirus vectors (F/HN-SIV and VSVG-HIV) in this screening. Cardiac fibroblasts and cardiomyocytes were infected with AAV and lentivirus vectors expressing GFP, and the cells were analyzed by FACS after 1 week. We found that the serum type X AAV vector (AAV-X) and lentiviral vectors preferentially infected cardiac fibroblasts *in vitro*.

#### **(2) In vivo screening using mouse myocardial infarction model**

We used a mouse myocardial infarction (MI) model in this study, as a mouse DCM model does not exist. Cardiac fibroblasts in DCM and MI hearts were derived from cells of the same origin and showed similar characteristics. We generated large amounts of AAV-GFP and lentiviral GFP vectors for infection in the MI model and analyzed the expression of GFP in infarct hearts after 2 and 4 weeks. Both AAV-GFP and lentiviral GFP preferentially infected cardiac fibroblasts in the infarct zones, but not in remote healthy myocardium.

#### **(3) Identification of cardiac fibroblast-specific promoters**

We next determined the promoter regions specifically expressing transgenes in cardiac fibroblasts. We selected several candidate promoter sequences by analyzing the gene expression patterns in fibroblasts using

bioinformatics. We cloned the candidate promoters in the luciferase vector, infected these luciferase vectors into primary cultured cardiac fibroblasts and cardiomyocytes, and evaluated the luciferase activity after 1 week. We identified a novel cardiac fibroblast-specific promoter sequence in which luciferase activity was stronger in fibroblasts than in cardiomyocytes.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 10件、国際誌 13件）

家田真樹

1. Kojima H, **Ieda M**. Discovery and progress of direct cardiac reprogramming. *Cell Mol Life Sci*. 2017 Feb 14. doi: 10.1007/s00018-017-2466-4.
2. **Ieda M**, Heart Development, Diseases, and Regeneration- New Approaches From Innervation, Fibroblasts, and Reprogramming. *Circ J*. 2016 Sep 7.
3. Ono T, Kamimura N, Matsushashi T, Nagai T, Nishiyama T, Endo J, Hishiki T, Nakanishi T, Shimizu N, Tanaka H, Ohta S, Suematsu M, **Ieda M**, Sano M, Fukuda K, Kaneda R. The histone 3 lysine 9 methyltransferase inhibitor chaetocin improves prognosis in a rat model of high salt diet-induced heart failure. *Sci Rep*. 2017;7:39752. doi: 10.1038/srep39752.
4. **家田真樹** 医学出版 レジデント 慶應循環器内科カンファレンス”経カテーテル大動脈弁留置術後に閉塞性肥大型心筋症様の血行動態となり心不全症状を呈した一例”，第9巻7号， p120-127, 2016.
5. 九石優樹、**家田真樹** 日本臨床社 最新冠動脈疾患学（下巻） “再生医療—ダイレクタープログラミング”，第74巻6号， p183-187, 2016.
6. 田村文弥、**家田真樹** 循環器専門医 ”Heart Regeneration by Direct Cardiac Reprogramming in Heart Failure”、第24巻第2号， p211-217, 2016.
7. **家田真樹** 心臓 心臓再生治療の現状と展望 イントロダクション 第48巻第12号， p1333, 2016.
8. 貞廣威太郎、**家田真樹** 心臓 心臓再生治療の現状と展望 心筋リプログラミングによる心臓再生 第48巻第12号， p1351-1356, 2016.
9. 黒津祥太、**家田真樹** Clinical Calcium メカノバイオサイエンス “心疾患とメカノバイオサイエンス” 第26巻12号， p1697-1702, 2016.
10. 山川裕之、**家田真樹** 細胞 心不全研究の最前線 “心不全患者に対する心筋再生医療の確立 -創薬から心筋移植まで-” 第48巻12号， p586-590, 2016.
11. 宮本和享、**家田真樹** 心臓 第50回河口湖心臓討論会 “心筋直接リプログラミングによる心筋再生” 第49巻 第2号， p202-209, 2017.

水上 浩明

1. Abe, H., Tani, T., Mashiko, M., Kitamura, N., Miyakawa, N., Mimura, K., Sakai, K., Suzuki, W., Kurotani, T., **Mizukami, H.**, Watakabe, A., Yamamori, T., Ichinohe, N.: 3D reconstruction of brain section images for making axonal projection maps in marmosets. *J Neurosci Methods*, *in press*.

2. Kurosaki, F., Uchibori, R., Mato, N., Sehara, Y., Saga, Y., Urabe, M., Mizukami, H., Sugiyama, Y., Kume, A.: Optimization of adeno-associated virus vector-mediated gene transfer to the respiratory tract. **Gene Ther**, *in press*.
3. Takaji, M., Takemoto, A., Yokoyama, C., Watakabe, A., Mizukami, H., Ozawa, K., Onoe, H., Nakamura, K., Yamamori, T.: Distinct roles for primate caudate dopamine D1 and D2 receptors in visual discrimination learning revealed using shRNA knockdown. **Sci Rep**. 6:35809, 2016.
4. Isoo, N., Ohno, T., Isowaki, M., Fukuda, S., Murabe, N., Mizukami, H., Ozawa, K., Mishina, M., Sakurai, M.: The decline in synaptic GluN2B and rise in inhibitory neurotransmission determine the end of a critical period. **Sci Rep**. 6:34196, 2016.
5. Kobayashi, M., Usui, F., Karasawa, T., Kawashima, A., Kimura, H., Mizushina, Y., Shirasuna, K., Mizukami, H., Kasahara, T., Hasebe, N., Takahashi, M.: NLRP3 Deficiency Reduces Macrophage Interleukin-10 Production and Enhances the Susceptibility to Doxorubicin-induced Cardiotoxicity. **Sci Rep**. 6:26489, 2016.
6. Csikota, P., Fodor, A., Balázsfi, D., Pintér, O., Mizukami, H., Weger, S., Heilbronn, R., Engelmann, M., Zelena, D.: Vasopressinergic control of stress-related behavior: studies in Brattleboro rats. **Stress**. 19:349-361, 2016.
7. Maeda, H., Fukuda, S., Kameda, H., Murabe, N., Isoo, N., Mizukami, H., Ozawa, K., Sakurai M.: Corticospinal axons make direct synaptic connections with spinal motoneurons innervating forearm muscles early during postnatal development in the rat. **J Physiol**, 594:189-205, 2016.
8. Hidema, S., Fukuda, T., Hiraoka, Y., Mizukami, H., Hayashi, R., Otsuka, A., Suzuki, S., Miyazaki, S., Nishimori, K.: Generation of *Oxtr cDNAHAHA-Ires-Cre* Mice for Gene Expression in an Oxytocin Receptor Specific Manner. **J Cell Biochem**, 117:1099-1111, 2016.
9. Kasahara, T., Takata, A., Kato, T. M., Kubota-Sakashita, M., Sawada, T., Kakita, A., Mizukami, H., Kaneda, D., Ozawa, K., Kato T.: Depression-like Episodes in Mice Harboring mtDNA Deletions in Paraventricular Thalamus. **Mol Psychiatr**, 21:39-48, 2016.
10. 水上 浩明 血友病に対する遺伝子治療の現状と展望「今、着実に実り始めた遺伝子治療-最新研究と今後の展開」(メディカルドゥ) pp173-8. 2016年6月刊
11. 水上 浩明: アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターとそのレセプターについて「血液フロンティア」2017年3月号 医薬ジャーナル社

井上 誠

1. Alton EW, Beekman JM, Boyd AC, Brand J, Carlon MS, Connolly MM, Chan M, Conlon S, Davidson HE, Davies JC, Davies LA, Dekkers JF, Doherty A, Gea-Sorli S, Gill DR, Griesenbach U, Hasegawa M, Higgins TE, Hironaka T, Hyndman L, McLachlan G, Inoue M, Hyde SC, Innes JA, Maher TM, Moran C, Meng C, Paul-Smith MC, Pringle IA, Pytel KM, Rodriguez-Martinez A, Schmidt AC, Stevenson BJ, Sumner-Jones SG, Toshner R, Tsugumine S, Wasowicz MW, Zhu J. Preparation for a first-in-man lentivirus trial in patients with cystic fibrosis. *Thorax*. 72(2):137-147 (2017).

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

家田真樹

1. **Masaki Ieda 2016 ISHR World Congress Symposium** “Converting fibroblasts into cardiomyocytes” Buenos Aires, Argentina **2016.4.18-21**
2. **Masaki Ieda Cardiovascular Development and Regeneration Symposium**, "Direct cardiac reprogramming and cell fate decision", San Francisco, USA **2016. 5.13-14**
3. **Masaki Ieda The 5th Gwangju-Boston Joint Cardiology Symposium**, “Making New Cardiomyocytes by Direct Reprogramming” Gwangju, South Korea **2016. 5.20-21**
4. **Masaki Ieda Tsukuba Global Science Week (TGSW) 2016** Toward the Application of Human Biology Basic Researches “Direct Cardiac Reprogramming, Regeneration, and Cell Fate Decision” Tsukuba, Japan **2016. 9.18**
5. **Masaki Ieda American Heart Association Scientific Sessions 2016**, Novel Insights into Cardiac Development, “Molecular Mechanisms of Cardiac Reprogramming”, New Orleans, USA **2016.11.12-16**
6. **Masaki Ieda Japan-Spain Joint Workshop on Nanomedicine Research** “Direct Cardiac Reprogramming and Heart Regeneration” Madrid, Spain **2016.12.1-2**
7. **Masaki Ieda American College of Cardiology: New York Cardiovascular Symposium** “Induced Pluripotent Stem Cells and Direct Cardiac Reprogramming – Solving Barriers for a Powerful Future: The 2016 New Experimental and Clinical Information” New York, USA **2016. 12.9-11**
8. **Masaki Ieda Joint MRC-AMED Workshop – Regenerative Medicine** “*Direct Cardiac Reprogramming and Heart Regeneration*” London, England **2017.3.1-2**
9. **家田真樹 「若手研究者フォーラム 2016 次世代バイオ医薬・再生医療を支える基盤技術開発」** “心筋直接リプログラミングの開発と再生医療への応用” 東京 **2016.7.26**
10. **家田真樹 犬山不整脈カンファレンス** “Fibroblast から心筋細胞への分化誘導” 名古屋 **2016.8.20**
11. **家田真樹 埼玉心臓集談会** “心臓の発生・病態の解明と心筋再生への挑戦” 埼玉 **2016.9.8**
12. **家田真樹 川口湖心臓討論会** “心筋直接リプログラミングによる心筋再生: Direct Cardiac Reprogramming and Heart Regeneration" 博多 **2016.9.10-11**
13. **家田真樹 MSD web 講演会** “心臓発生・病態解明と心筋再生への挑戦” 東京, **2016.10.26**
14. **家田真樹 CREST-PRIME 「メカノバイオロジー」領域ミーティング** “伸展刺激による心筋リプログラミング制御の分子機構解明と心臓再生への応用” 東京 **2017.1.26-27**
15. **家田真樹 第7回 Tokyo Aztrium Cardiology Conference** “心筋直接誘導による新しい心臓再生法の開発” 東京 **2017. 2.13**
16. **家田真樹 第81回日本循環器学会シンポジウム** ”Direct Cardiac Reprogramming for Heart Regeneration” 金沢 **2017. 3.17-19**
17. **家田真樹 第81回日本循環器学会 ラウンドテーブルディスカッション** 「重症心不全治療における非薬物学的介入の今後への展望」”Future Perspectives for Cardiac Regenerative Therapy by Direct Reprogramming” 金沢 **2017. 3.17-19**
18. **家田真樹 第81回日本循環器学会 心筋生検研究会ジョイントセッション** ”心筋リプログラミングにより心臓線維化を治療する” 金沢 **2017. 3.17-19**

19. 家田真樹 幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム事業内交流会 “ダイレクトリプログラミングによる心臓再生と分子基盤解明” 東京 2017. 3.22
20. 田村文弥、家田真樹、鈴木岳之、中谷晴昭、原田信広、古川哲史、黒川洵子 “心電図 QT 間隔に対するエストロゲン類の影響” 第 134 回薬理学会関東部会 東京 2016.7.9
21. Taketaro Sadahiro, Naoto Muraoka, Kazutaka Miyamoto, Hiroyuki Yamakawa, Hidenori Kojima, Shou Haginiwa, Keiichi Fukuda, Masaki Ieda. “**Tbx6 directly programs fibroblasts and pluripotent stem cells into cardiac mesodermal cells**” 第33回国際心臓研究学会日本部会 Featured Research Session、東京 2016.12.16-17
22. Kazutaka Miyamoto, Hiroyuki Yamakawa, Naoto Muraoka, Taketaro Sadahiro, Tomohiko Umei, Mari Isomi, Mizuha Akiyama, Keiichi Fukuda, Masaki Ieda. “自然免疫シグナル活性化を機序としたセンダイウイルスを用いた効率的かつ安全な心筋直接誘導法の確立” 第20回日本適応医学会学術集会、東京 2016.12.16-17
23. 田村文弥、家田真樹、鈴木岳之、福田恵一、中谷晴昭、原田信広、古川哲史、黒川洵子 “女性ホルモンが心電図QT間隔に与える影響” 第20回日本適応医学会学術集会、東京 2016.12.16-17
24. Kazutaka Miyamoto, Hiroyuki Yamakawa, Naoto Muraoka, Taketaro Sadahiro, Mari Isomi, Mizuha Akiyama, Tsunehisa Yamamoto, Keiichi Fukuda, Masaki Ieda “Efficient and Safe Cardiac Reprogramming using Sendai Viral Vectors” 第81回日本循環器学会 金沢 2017.3.17-19
25. Taketaro Sadahiro, Mari Isomi, Naoto Muraoka, Kazutaka Miyamoto, Hiroyuki Yamakawa, Hidenori Kojima, Shou Haginiwa, Mizuha Akiyama, Yuki Kuishi, Shugo Tohyama, Hiroyuki Miyoshi, Yoshifumi Kawamura, Naoki Goshima, Keiichi Fukuda, Masaki Ieda. “**Tbx6 Induces Cardiac Mesoderm Program in Fibroblasts and Pluripotent Stem Cells**” 第81回日本循環器学会 金沢 2017.3.17-19

水上 浩明

26. Mizukami, H.: Current Status of AAV-mediated Gene Transfer and Gene Therapy. Adaptive Circuit Shift International Workshop on the Strategy for Neuroscience: Viral Vector Technology for Neural Circuit and Pathology Research, Okazaki, December 8-10, 2016. (口頭発表)
27. Mizukami, H., Ohmori, T., Uchibori, R., Saga, Y., Urabe, M., Kume, A., Sakata, Y., Ozawa, K.: Duration of factor IX expression in macaques following AAV8-mediated liver transduction. American Society of Gene and Cell Therapy 19th Annual Meeting, Washington DC, USA, May 4-7, 2016. (ポスター発表)

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願