

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) 革新的先端研究開発支援事業ソロタイプ「メカノバイオロジー機構の解明による革新的医療機器及び医療技術機器及び医療技術の創出」研究開発事業
(英語) Advanced Research & Development Programs for Medical Innovation solo-type, “Elucidation of Mechanobiological Mechanisms and Their Application to the Development of Innovative Medical Instruments and Technologies”

研究開発課題名： (日本語) 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
(英語) Cardiac reprogramming and heart regeneration via mechano-transduction

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 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要（総括研究報告）

心臓は拍動する臓器で常に機械的刺激を受けており、心臓の発達や心筋の成熟にメカニカルストレスは重要な役割を担う。心筋の分化成熟過程で機械的刺激が必須であることは明らかにされているが、心筋分化の運命決定における機械的刺激の役割は不明である。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報告し、さらに生体内に心筋リプログラミング因子を導入することで心臓に内在する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可能であることを報告してきた（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）。これまで機械的刺激による細胞リプログラミングの報告はないが、我々は生体内の心臓拍動下で誘導した心筋は培養皿上の静止状態で誘導した心筋に比べてリプログラミング効率が高いことを見出した。本研究ではメカノ刺激による心筋リプログラミング制御の分子機構を明らかにして心臓再生への応用を目指す。本年度は生体内での心筋リプログラミングのメカノ刺激を細胞培養系で再現するため、1. 組織の硬さ、2. ストレッチ刺激の両面の効果を解析した。

1. メカノ刺激による心筋リプログラミング制御

我々は生体内での心筋リプログラミングのメカノ刺激を細胞培養系で再現するため、1. 組織の硬さ、2. ストレッチ刺激の両面の効果を解析した。これまでに 1. 組織の硬さの検討で下記のように興味深い実験結果がでた。また本年度の実験で 2. ストレッチ刺激はストレックス社の培養細胞ストレッチ装置では長期培養が困難であった。

(1) 柔らかい心臓組織を *in vitro* で再現し、基質の硬さによる心筋リプログラミング解析

柔らかい心臓組織を *in vitro* で再現するため、名戸ヶ谷病院研究所の原田伊知郎先生との共同研究で基質の硬さを自在に変化できる細胞培養系を確立した。原田伊知郎先生は工学系の専門家であり、様々な硬さのハイドロゲル培養皿を作製することに成功している。具体的には、原田先生が作製した様々な硬度のハイドロゲルとプラスチック培養皿を用いて心筋リプログラミング効率を解析した。心筋リプログラミング効率は我々が開発した心筋細胞のみで特異的に GFP を発現する α MHC-GFP トランスジェニックマウスの線維芽細胞を用いて解析した。様々な硬さの培養皿上に線維芽細胞を撒き、翌日心筋リプログラミング因子を遺伝子導入して、線維芽細胞から心筋細胞へのリプログラミング効率を FACS や免疫染色で心筋細胞マーカー α MHC-GFP の発現などで解析した。心筋生理機能を拍動細胞数のカウントや、Ca イメージングなどで解析した。その結果、心筋リプログラミング効率を促進する最適な硬度のハイドロゲル条件を決定した。

(2) 培養細胞ストレッチ装置による、ストレッチ刺激による心筋リプログラミング解析

ストレッチ装置を用いて心筋リプログラミング効率の変化を解析する。本年度に東京医科歯科大の古川哲史教授との共同研究でストレックス社の培養細胞ストレッチ装置を用いて解析を行った。上記と同様に、線維芽細胞を培養皿に撒き翌日心筋リプログラミング因子を遺伝子導入して、線維芽細胞から心筋細胞へのリプログラミング効率を FACS や免疫染色で解析する予定であった。しかしながら、遺伝子導入後に 1 週間以上の長期培養を行うと細胞がはがれてしまうという課題が判明し、ストレッチ刺激による心筋リプログラミングの変化を観察できなかった。今後は器材を変えて、線維芽細胞にストレッチを加える細胞培養系で長期間培養が可能か、心筋リプログラミングが改善するか検討する。

Results

The heart is always exposed to mechanical stimulation, and mechanical stress is necessary for proper cardiac development and cardiomyocyte maturation. However, it remains unknown whether the cell fate of cardiomyocytes is determined by mechanical stimulation. We previously reported that cardiac-specific transcription factors, including Gata4, Mef2c, and Tbx5, reprogrammed fibroblasts into induced cardiomyocyte-like cells (iCMs) *in vitro* and *in vivo*. Moreover, *in vivo* cardiac reprogramming can regenerate injured hearts and improve cardiac function (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). In these experiments, we found that the efficiency and degree of cardiac reprogramming were better under *in vivo* than under *in vitro* conditions. In this study, we will elucidate the link between mechanical stimulation and cardiac reprogramming, identify the underlying molecular mechanisms, and apply the findings to regenerative medicine. Specifically, this year, we have investigated the effects of mechanical stimulation on cardiac reprogramming *in vitro* by using (1) various degrees of soft culture dishes and (2) a mechanical stretch instrument.

1 . Mechanical stimulation and cardiac reprogramming

To recapitulate cardiac reprogramming in *in vivo* microenvironments, we used (1) hydrogel soft culture dishes and (2) a mechanical stretch instrument. This year, we found interesting results by using soft culture dishes as described below. We also found that the transduced cells peeled away and could not attach in culture for a prolonged period under mechanical stretch.

(1) Cardiac reprogramming in soft culture dishes

To recapitulate the *in vivo* microenvironment, in which the myocardial tissues are softer than plastic culture dishes, we developed an *in vitro* culture system using soft hydrogel in collaboration with Dr. Ichiro Harada from Nadogaya Hospital Research Institute. Dr. Harada is an expert in mechanics and successfully generated various degrees of soft dishes using hydrogel. We cultured the fibroblasts in the soft hydrogel and plastic dishes and compared cardiac reprogramming efficiency. We used α MHC-GFP transgenic mice, in which only mature cardiomyocytes expressed GFP, to analyze cardiac reprogramming efficiency. We split mouse fibroblasts, infected cardiac reprogramming factors, and analyzed reprogramming efficiency by FACS and immunohistochemistry. We also counted the number of spontaneously beating iCMs and Ca^{2+} transient expressing iCMs by microscopy to determine the function of iCMs. We found that the appropriate degree of soft culture dishes could improve cardiac reprogramming compared to culture in plastic dishes.

(2) Cardiac reprogramming under mechanical stretch

We also analyzed cardiac reprogramming under mechanical stretch using a specialized instrument. We used a mechanical stretch instrument (Strex Corp.) in collaboration with Prof. Tetsushi Furukawa from Tokyo Medical and Dental University. We split mouse fibroblasts on the wells in the stretch instrument and infected cardiac reprogramming factors to determine the effects of mechanical cyclic stretch. We found that transduced cells were peeled away from the bottom and could not attach for longer than 1 week using this instrument. We will change the mechanical stretch instrument next year to overcome this issue and analyze cardiac reprogramming.

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 8件、国際誌 3件）

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, Matsuhashi 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） “再生医療ーダイレクトリプログラミング”，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TRODakシヨN 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** C l i n i c a l C a l c i u m 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.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

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ランス “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ドラ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**

(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