

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08069

研究課題名(和文) デスモゾーム関連心筋症の分子病態解明と治療標的の同定

研究課題名(英文) Clarification of molecular pathophysiology and identification of therapeutic target in desmosome-related cardiomyopathy

研究代表者

彦惣 俊吾 (Hikoso, Shungo)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：30423164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：デスモゾーム構成分子であるdesmoglein2(DSG2)にR119X-homo変異を有する拡張型心筋症症例由来のiPS細胞およびそのアイソジェニックコントロール細胞を作成し、それぞれから心筋細胞を分化誘導して、心筋細胞の3次元組織化を行い表現型の検討をおこなった。変異を有する心筋組織では、収縮力の有意な低下、デスモゾーム構造の破壊と細胞質内への蓄積、異常電位の増加が認められた。コントロール細胞およびDSG2を発現するアデノ随伴ウイルスベクターの使用により上記の異常は改善していた。これらの結果は、desmoglein 2を後天的に補充することによって病態が改善する可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、デスモゾーム構成分子であるDSG2の欠損に伴う拡張型心筋症の患者由来iPS細胞由来心筋において、デスモゾーム構造の破壊やそれに伴う組織化の異常、異常電位の発生など、患者の病態を再現することができ、詳細な表現形や機序の検討に繋がる知見が得られた。また、他のデスモゾーム構成分子であるDSC2の発現低下を認めるなど、一つの構成分子の欠損によりデスモゾーム構造全体の異常につながることも見出した。これらの知見は、デスモゾーム関連分子異常による心筋症のメカニズム解明に有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We identified a homozygous stop-gain mutations in DSG2 (c.C355T, p.R119X) that led to complete desmoglein-2 deficiency in a patient with severe biventricular heart failure. Induced pluripotent stem cells were generated from the patient (R119X-iPSC), and the mutated DSG2 gene locus was heterozygously corrected to a normal allele via homology-directed repair (HDR-iPSC). We detected abnormal electrical excitation in R119X-iPSC-CMs but not HDR-iPSC-CMs. Three-dimensional self-organized tissue rings (SOTRs) revealed tissue fragility and a weak maximum force in SOTRs from R119X-iPSC-CMs. These phenotypes were significantly recovered in HDR-iPSC-CMs. Myocardial fiber structures in R119X-iPSC-CMs were severely aberrant, and desmosomes were disrupted in these cells. The absence of desmoglein-2 in R119X-iPSC-CMs led to decreased expression of desmocollin-2. Adeno-associated virus-mediated replacement of DSG2 significantly recovered the contraction force in SOTRs generated from R119X-iPSC-CMs.

研究分野：心不全

キーワード：拡張型心筋症 デスモゾーム iPS細胞 病態モデル

1. 研究開始当初の背景

特発性心筋症は、遺伝的要因が強く多くの原因遺伝子が同定されているが、その中に DSG2, plakophilin2 (PKP2), plakoglobin (JUP), desmocollin2 (DSC2)など、細胞間接着に重要なデスモゾーム構成分子の一群が知られている。デスモゾーム関連遺伝子異常は以前より不整脈原性右室異常症 (ARVC) の原因として知られていたが、近年の高速シーケンス解析の発展により、拡張型心筋症症例でも数多く見つかっており、デスモゾーム異常による介在板構造の脆弱性は拡張型心筋症において重要な機序であると考えられる。デスモゾーム異常に伴う心筋症では心室筋に心筋細胞死や脂肪変性が生じることが知られているが、細胞間接着構造体であるデスモゾームの機能異常が、どのようにして心筋細胞死や脂肪変性を惹起し重症心不全の発症につながるのか、その詳細な分子機序は依然不明である。

2. 研究の目的

本研究では、我々が見出した DSG2-R119X-homo 変異を有する拡張型心筋症症例由来の心筋組織、iPS 細胞分化心筋細胞を用いて病態を詳細に検討することにより、ヒトにおけるデスモゾーム異常が心筋症を発症する分子機序を解明し、新規特異的治療法に繋がる知見を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

患者の表現型の詳細な検討

DSG2-R119X-homo 変異を有する拡張型心筋症症例の臨床像を心電図、心エコー検査にて評価した。また、心筋組織を用いて、線維化の評価、免疫組織染色によるデスモゾームおよびその他の細胞間接着因子の分布や発現の検討をおこなう。また、デスモゾームなどの細胞間接着構造の詳細を電子顕微鏡にて観察した。

患者由来 iPS 細胞および遺伝子改変による変異修復細胞の作製ならびに特性評価

DSG2-R119X-homo 変異を有する拡張型心筋症症例の患者末梢血から単核球を分離し、初期化因子をセンダイウイルスベクターで導入し、患者由来 iPS 細胞を作製した。作製した iPS 細胞に CRISPR/Cas9 システムを用いて、アミノ酸の R119X 変異の原因となっている塩基配列 C355T 変異の騒動組み換えを用いた修復をおこない、変異修復 iPS 細胞を作成して対照細胞とした。細胞の分化能、核型、細胞間接着装置の構造、発現などの特性を評価した。

患者由来 iPS 細胞心筋の表現型の検討

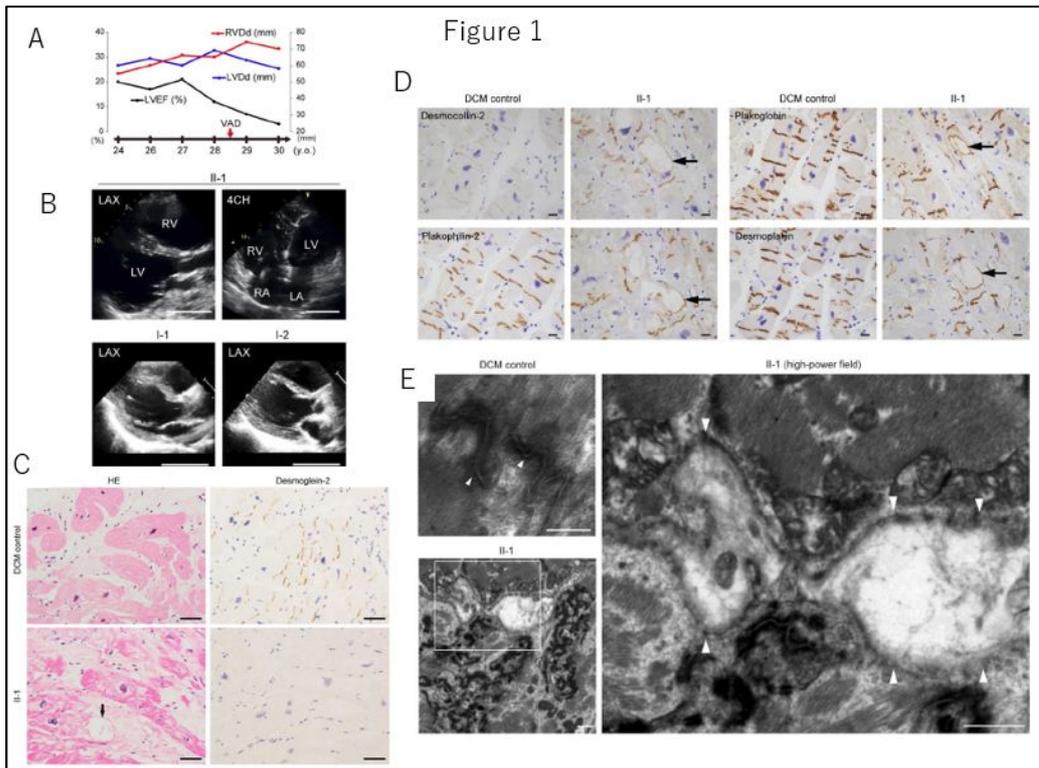
患者由来 iPS 細胞および対照細胞を心筋細胞に分化させ、multielectrode array (MEA) システム (USB-ME64-System; Multi Channel Systems, Germany) にて電氣的興奮を評価した。また、Li らの方法により 3 次元自己組織化リング (self-organizing tissue ring: SOTR) を作製した (Commun Biol, 3, 122, 2020)。SOTR の構造を光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて検討した。また、MicroTester G2 システム (CellScale Biomaterials Testing, Waterloo, ON, Canada) を用いて心筋収縮能の評価を行った。

DSG2 発現アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) の作製および患者由来 iPS 細胞心筋の表現型に対する効果の検討

ヒト DSG2 を発現する AAV (AAV2-DSG2) を、HEK293 細胞を用いて作成した。患者由来 iPS 細胞心筋に感染させ、その表現型に対する効果を検討した。

4. 研究成果

DSG2-R119X 変異を有する拡張型心筋症患者の表現型の検討



DSG2-R119X 変異 (C355T 変異) を有する患者は、経時的な左室収縮力 (LVEF) の低下 (Figure 1A)、左右両心室の拡大 (Figure 1B)、心筋組織の著明な線維化と DSG2 発現の消失を認めた (Figure 1C)。また免疫組織染色にて、他のデスモゾーム分子である desmocollin-2 (DSC2) および plakophilin (PKP2) の異常分布を認めた (Figure 1D)。また電子顕微鏡にて、デスモゾーム構造の破壊と細胞内への異常蓄積が認められた (Figure 1E)。

患者由来 iPS 細胞および遺伝子改変による変異修復細胞の作製ならびに特性評価
患者由来 iPS 細胞 (R119X-iPSCs) は DSG2 の発現が消失していた。R119X 変異を相同組み換えにより修復するコンストラクトを作成し、修復した iPS 細胞を作製した。HDR-iPSCs では DSG2 の発現の回復が認められた。また R119X-iPSCs, HDR-iPSCs とともに初期化因子の発現、核型には大きな問題は認められなかった。また心筋細胞の分化についても特に大きな差は認められなかった。

患者由来 iPS 細胞心筋の表現型の検討

R119X-iPSCs および HDR-iPSCs を心筋細胞に分化させ (R119X-iPSC-CMs, HDR-iPSC-CMs) (Figure 2A)、MEA にて活動電位を評価したところ、R119X-iPSC2-CMs では不規則な異常興奮活動の増加が認められた (Figure 2B, 2C)。また、刺激伝播速度の低下も認められた。また iPS 細胞を心筋細胞に分化後、SOTR を作製し (Figure 2A)、MicroTester にて心筋収縮性を評価したところ、

R119X-iPSC-CMs で作製した SOTR において、有意な組織脆弱性 (Figure 2G) 収縮性の低下 (Figure 2H, 2G) が認められた。また、R119X-iPSC-CMs では DSG2 の発現とともに DSC2 の発現も低下していた (Figure 3A, 3B) が、その他のデスモゾーム関連分子の発現には影響は認められなかった。一方で、R119X-iPSC-CMs で作製した SOTR では、組織が網目状構造を呈しており、トロポニン陽性面積の低下を認めた (Figure 3D, 3E)。電子顕微鏡では、デスモゾーム構造の消失、細胞間の乖離が認められた (Figure 3F)。

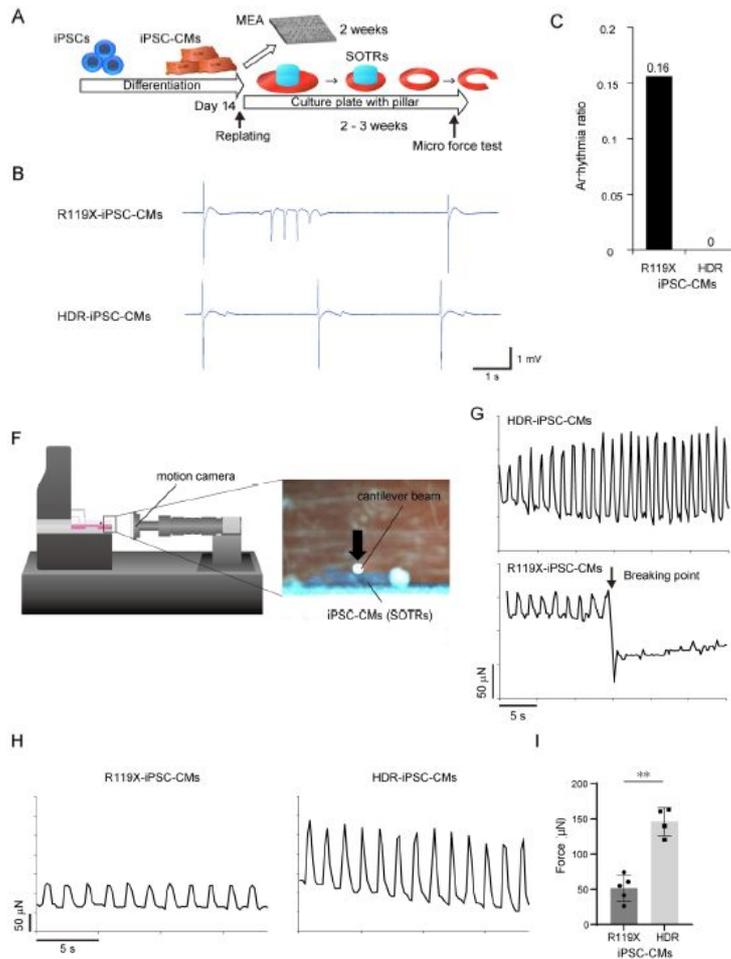


Figure 2

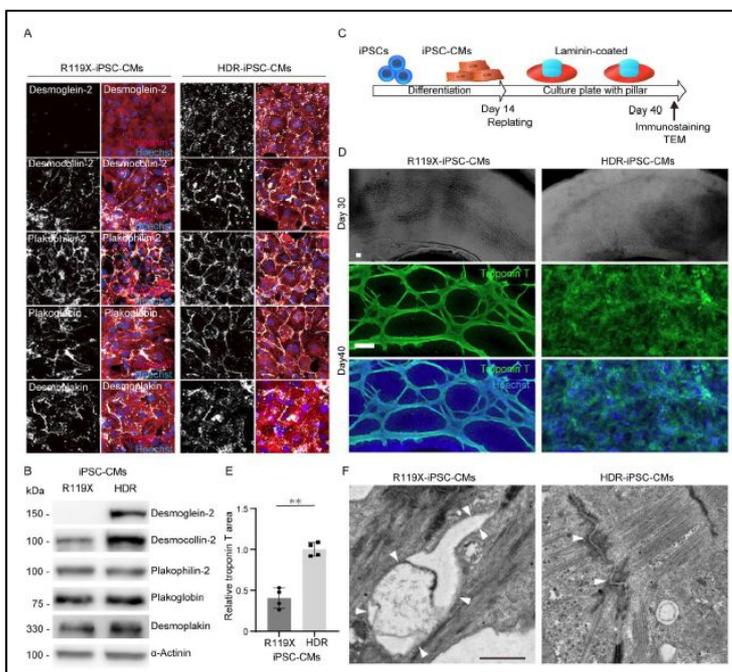


Figure 3

DSG2 発現アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) の作製および患者由来 iPSC 細胞心筋の表現型に対する効果の検討

AAV2-DSG2 を作製し (Figure 4A) R119X-iPSC-CMs に感染させたところ、DSG2 の発現が回復した (Figure 4B, 4C)。また同時に、DSC2 の発現も回復した (Figure 4D)。AAV2-DSG2 を感染させた R119X-iPSCs-CMs を用いて SOTR を作製し (Figure 4E) 収縮能を検討したところ、AAV2-DSG2 の感染により収縮能の改善が認められた (Figure 4F)。

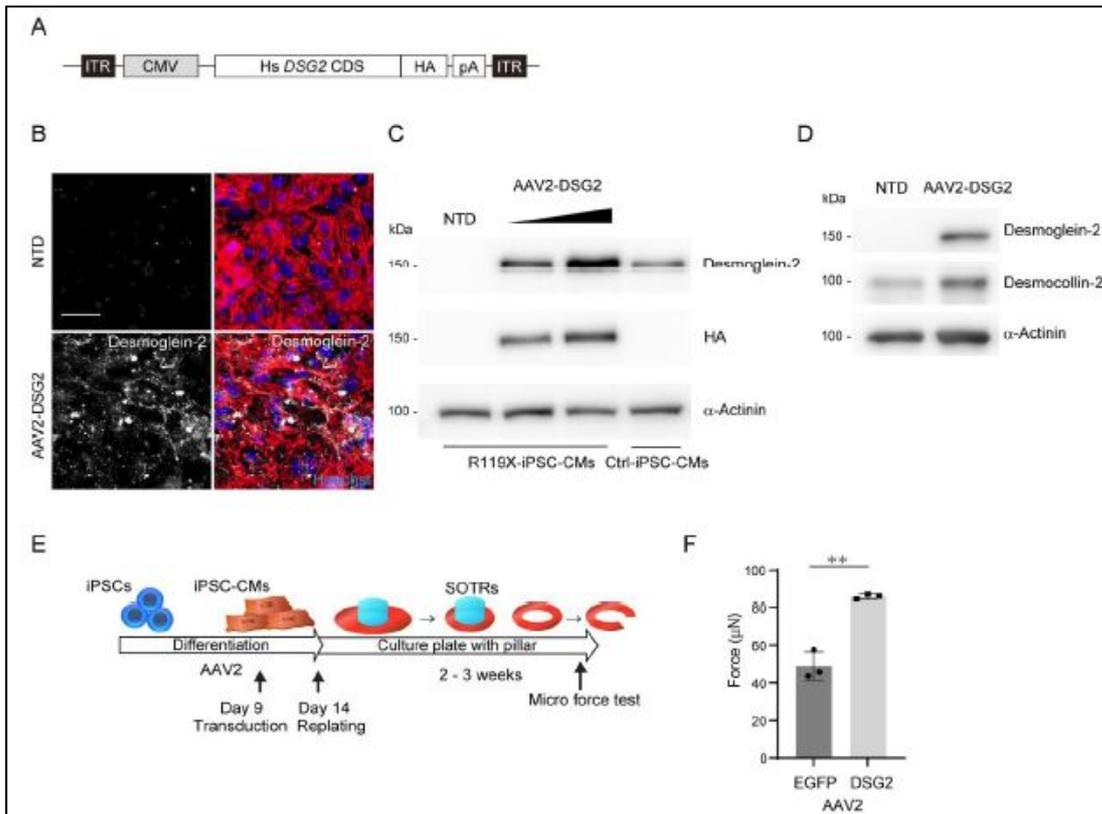


Figure 4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shiba Mikio, Higo Shuichiro, Kondo Takumi, Li Junjun, Liu Li, Ikeda Yoshihiko, Kohama Yasuaki, Kameda Satoshi, Tabata Tomoka, Inoue Hiroyuki, Nakamura Satoki, Takeda Maki, Ito Emiko, Takashima Seiji, Miyagawa Shigeru, Sawa Yoshiki, Hikoso Shungo, Sakata Yasushi	4. 巻 -
2. 論文標題 Phenotypic Recapitulation and Correction of Desmoglein-2-deficient Cardiomyopathy using Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/hmg/ddab127	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kohama Yasuaki, Higo Shuichiro, Masumura Yuki, Shiba Mikio, Kondo Takumi, Ishizu Takamaru, Higo Tomoaki, Nakamura Satoki, Kameda Satoshi, Tabata Tomoka, Inoue Hiroyuki, Motooka Daisuke, Okuzaki Daisuke, Takashima Seiji, Miyagawa Shigeru, Sawa Yoshiki, Hikoso Shungo, Sakata Yasushi	4. 巻 10
2. 論文標題 Adeno-associated virus-mediated gene delivery promotes S-phase entry-independent precise targeted integration in cardiomyocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-72216-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 志波幹夫, 肥後修一朗, 近藤匠巳, 李俊君, 劉莉, 小濱康明, 亀田聡士, 田端智香, 井上裕之, 中村聡希, 武田真季, 池田善彦, 高島成二, 宮川繁, 澤芳樹, 彦惣俊吾, 坂田泰史
2. 発表標題 Phenotypic Recapitulation and Correction of Desmoglein-2-deficient Cardiomyopathy using Human induces Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes
3. 学会等名 日本心臓病学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 肥後修一朗, 増村雄喜, 彦惣俊吾, 坂田泰史
2. 発表標題 Clinical application of genome editing for advanced heart failure
3. 学会等名 第22回日本心不全学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 肥後修一朗、増村雄喜、彦惣俊吾、坂田泰史
2. 発表標題 Clinical application of genome editing for advanced heart failure
3. 学会等名 第22回日本心不全学会学術集会（東京、2018年9月11日～13日）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田端智香, 肥後修一朗, 増村雄喜, 志波幹夫, 小濱康明, 近藤匠巳, 亀田聡士, 井上裕之, 中村聡希, 高島成二, 宮川繁, 澤芳樹, 彦惣俊吾, 坂田泰史
2. 発表標題 ハイコンテンツイメージング・数値計算ソフトウェアを用いた心筋症iPS 分化心筋におけるカルシウム動態解析
3. 学会等名 第6回日本心筋症研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shuichiro Higo, Shungo Hikoso, Shigeru Miyagawa, Yoshiki Sawa, Yasushi Sakata
2. 発表標題 Generation of Human Disease Model for Personalized Medicine Targeting Intractable Cardiomyopathy
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 聡希, 肥後 修一朗, 志波 幹夫, 小濱 康明, 近藤 匠巳, 亀田 聡士, 田端 智香, 井上 裕之, 山崎 悟, 武田 真季, 高島 成二, 宮川 繁, 澤 芳樹, 彦惣 俊吾, 坂田 泰史
2. 発表標題 不整脈源性右室心筋症（ARVC）を迅速に再現するヒトモデル細胞の樹立
3. 学会等名 第6回日本心筋症研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasuaki Kohama, Shuichiro Higo, Mikio Shiba, Takumi Kondo, Satoki Nakamura, Satoshi Kameda, Tomoka Tabata, Hiroyuki Inoue, Seiji Takashima, Shigeru Miyagawa, Yoshiki Sawa, Shungo Hikoso, Yasushi Sakata
2. 発表標題 Adeno-associated Virus-mediated Gene Delivery Promotes S-Phase Entry-independent Homology-directed Repair in Cardiomyocytes
3. 学会等名 第24回日本心不全学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shuichiro Higo, Shungo Hikoso, Yasushi Sakata
2. 発表標題 Development of Precision Medicine for Arrhythmogenic Cardiomyopathy using Isogenic Human Disease Model
3. 学会等名 第85日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	肥後 修一朗 (Higo Shuichiro) (00604034)	大阪大学・医学系研究科・特任准教授(常勤) (14401)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	志波 幹夫 (Shiba Mikio)		
研究 協力者	小濱 康明 (Kohama Yasuaki)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	近藤 匠 (Kondo Takumi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関