

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19543

研究課題名(和文)難治性心筋症分子基盤に介入するアップストリーム治療法の開発

研究課題名(英文)Development of upstream therapy targeting molecular basis of refractory cardiomyopathy

研究代表者

坂田 泰史(Sakata, Yasushi)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00397671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：指定難病である拡張型心筋症や肥大型心筋症は、心臓移植の適応となる重症心不全の原因の多くを占め、遺伝子変異がその原因となる。本研究は、マウス心筋細胞を用いた相同組み換え(HDR)による修復効率の向上、重篤な分子変異に焦点化したヒト心筋症疾患iPS細胞の樹立、ゲノム編集技術を駆使した精密なヒト疾患iPS細胞アレル改変及び分化心筋病態解析を目的に遂行した。本研究では、アデノ随伴ウイルスによる遺伝子導入により、マウス成獣心臓組織においてDNA合成非依存的なHDRが生じるかを検証し、その技術を応用して、ヒトiPS分化心筋におけるゲノム編集を用いたHDR誘導を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

指定難病のひとつである拡張型心筋症や肥大型心筋症は、遺伝子の変異により生じるとされています。本研究では、様々な分野に応用されているゲノム編集技術を、心筋症治療に応用することを検討しました。これまで、心臓の細胞である心筋細胞では、正確なゲノム編集である「相同組み換え」が生じないとされていました。本研究では、大人のマウスの心臓組織において相同組み換えが生じるか、またiPS細胞から作成したヒトの心筋細胞において相同組み換えが生じるかを検証しました。本研究から、心筋症研究におけるゲノム編集の更なる応用が期待されます。

研究成果の概要(英文)：Dilated cardiomyopathy and hypertrophic cardiomyopathy are the major underlying diseases of advanced heart failure requiring heart transplantation, and caused by genetic mutations. In this project, we conducted experimental research according to the following purpose; improvement of the efficiency of homology-directed repair in mouse cardiomyocytes, generation of human disease-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) from patients with cardiomyopathy with pathological genetic mutations, functional analysis using cardiomyocytes differentiated from iPSCs (iPSC-CMs) with precise allele modification via genome editing.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心筋症 ゲノム編集 疾患iPS細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本における心臓移植希望登録者は年々増加し2016年時点で500名を超え、一方で心臓移植までの平均待機期間は1000日を超えている。左室補助人工心臓は重症心不全に対する有効な治療法だが、血栓症等移植待機中の様々な合併症のため多くの症例が失われているのが現状である。2017年時点で大阪大学医学部附属病院における心臓移植待機症例は140名を超え、神経体液性因子への薬物介入治療が発達した現代においても、重症心不全への治療介入は克服すべき大きな課題である。高速シーケンス技術の発展により、心筋症発症原因としての遺伝子変異、その分子メカニズムが明らかとなっており、大阪大学医学部循環器内科では臨床データ、ゲノム解析データの蓄積を継続してきた。更に、遺伝子変異に直接介入する方法としてゲノム編集技術の医療応用に取り組み、非分裂細胞では起こらないとされてきた正確な遺伝子修復につながる相同組み換え修復が心筋細胞で起こることを証明した。心臓を対象としたゲノム編集治療には多くの困難が伴うと考えられるが、心臓は全身に血液を送達するポンプであり、その機能不全は致死的である。このような背景を踏まえ、重篤で代替療法がない病態にターゲットを絞り、分子生物学的基盤を含めた詳細な病態解析を進めていくことが重要と考えられ、本研究計画を立案した。

2. 研究の目的

指定難病である拡張型心筋症や肥大型心筋症は、心臓移植の適応となる重症心不全の原因の多くを占める。シーケンス技術の発展により心筋症遺伝子変異が高い精度で同定され、その発症分子メカニズムが明らかになる一方、重症心不全に対する治療は、従来の薬物治療、ペースメーカー等の非薬物治療のみであり、上流の分子基盤異常に直接介入する方法は存在しない。CRISPR/Cas9ゲノム編集技術は、その高い効率及び特異性から多くの分野に爆発的な変革をもたらした医療応用も急速な勢いで進んでいる。正確な遺伝子改変を可能とする相同組み換え修復(Homology-Directed Repair: HDR)は、従来分裂細胞でのみ有効とされていたが、我々はアデノ随伴ウイルスによる遺伝子導入を介したゲノム編集により、培養心筋細胞において、DNA合成非依存的なHDRが生じることを見出し、拡張型心筋症を呈するトロポニン遺伝子変異ノックインマウス培養心筋細胞における正確なゲノム遺伝子変異の修復に成功した(Sci Rep.2017 Aug 24;7(1):9363)。上述の通り心筋細胞におけるゲノム編集治療の可能性が示されたものの、ヒト疾患への応用のためには、ゲノム編集の効率や安全性の向上といった技術開発だけでなく、重篤で他に代替療法が存在せず、かつ遺伝子そのものへの介入が必要と考えられる症例に焦点を絞った、詳細な病態解析が必要である。これらを踏まえ本研究は、

(1) マウス心筋細胞を用いたHDRによる修復効率の向上

(2) 重篤な分子変異に焦点化したヒト心筋症疾患 iPS 細胞の樹立

(3) ゲノム編集技術を駆使した精密なヒト疾患 iPS 細胞アレル改変及び分化心筋病態解析を行い、ゲノム編集の有効性を評価すると同時に、ヒト心筋症への応用の可能性を探求することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス心筋細胞を用いたHDRによる修復効率の向上

これまでに確立した培養心筋細胞におけるHDRを介したゲノム修復の定量評価法を用いて、心筋細胞での修復効率向上を目指す。

(2) 重篤な分子変異に焦点化したヒト心筋症疾患 iPS 細胞の樹立

重症心不全症例を対象にゲノム解析を行い、疾患 iPS 細胞を樹立、心筋に分化させ、ヒト疾患モ

デル細胞の樹立を試みる。

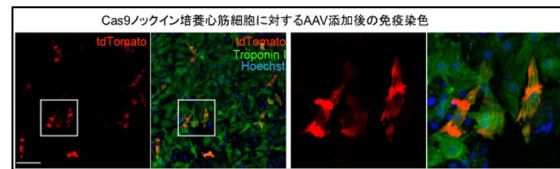
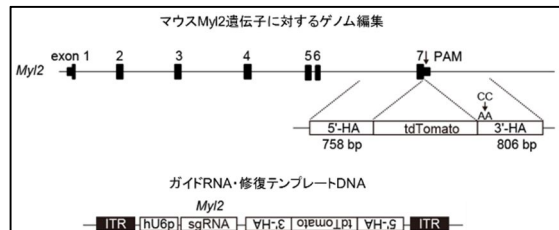
(3) ゲノム編集技術を駆使した精密なヒト疾患 iPS 細胞アレル改変及び分化心筋病態解析
ゲノム編集により変異を修復したアイソジェニックコントロールを作成し、心筋に分化させた後、機能解析を行う。

4. 研究成果

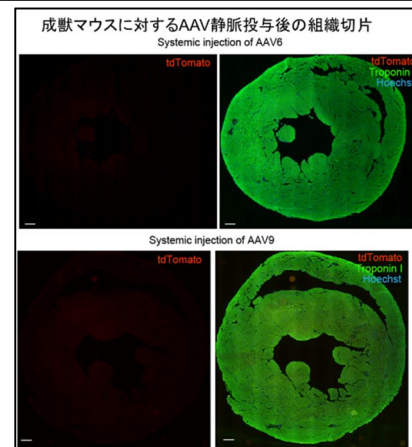
(1) マウス心筋細胞を用いた HDR による修復効率の向上

マウス *MyI2* 遺伝子は、Mlc2v (Myosin Regulatory Light Chain 2, Ventricular/Cardiac Muscle Isoform、ミオシン調節軽鎖) をコードし、心筋細胞特異的に発現する遺伝子である。

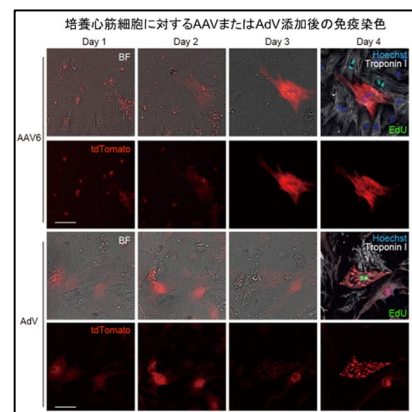
我々は、*MyI2* 遺伝子 3' 末端のストップコドン周辺を対象とするガイド RNA、及び同部位に対する相同配列で挟んだ tdTomato 蛍光タンパク質配列を修復テンプレートとして設計し、アデノ随伴ウイルス (AAV) により、Cas9 ノックインマウスから単離した培養心筋細胞に遺伝子導入することで、心筋細胞特異的な HDR が生じることを見出した (右上図)。しかし、心筋細胞において見出された HDR は、DNA 合成能や分裂能をわずかな



ながら保持した新生仔培養心筋細胞における観察に留まっており、分裂能を喪失した成獣マウス心臓組織において HDR が生じるかは不明であった。我々は、マウス成獣組織においても HDR が生じるかを検証するため、ガイド RNA 及び修復テンプレートをコードする AAV9 を作成した。新たに精製した AAV9 は、Cas9 ノックインマウス培養心筋細胞への添加により効率的に HDR を誘導した (右中図)。そこで、8 週例の Cas9 ノックインマウスに、従来の AAV6 及び AAV9 を経静脈的に投与したところ、これら AAV は成獣心臓組織に対して効率的に遺伝子を導入したものの、HDR を示唆する tdTomato 陽性の心筋細胞は観察されなかった (右下図)。そこで、これら精製 AAV を用いて、投与方法を変更することで成獣マウス心臓組織における HDR が誘導できないか、検証を続けた。



更に、異なる遺伝子導入法を検証するため、ガイド RNA 及び修復テンプレート DNA を AAV 及びアデノウイルス (AdV) に導入し、Cas9 ノックイン培養心筋細胞に添加した後 HDR の経時的観察を行った (右下図)。



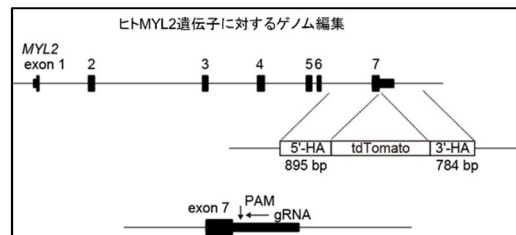
(2) 重篤な分子変異に焦点化したヒト心筋症疾患 iPS 細胞の樹立

細胞の機能維持に必須であり、タンパク質機能への影響が重篤な遺伝子変異にターゲットを絞り疾患 iPS 細胞を樹立した。我々は、特発性拡張型心筋症と診断され、難治性心室性不整脈及び両心室拡大を呈した症例に遺伝解析を行い、ホモ接合型デスモグレイン 2 (DSG2) ナンセンス変異を同定した。左室補助人工心臓植込み手術時に得られた左室心筋検体を用いて免疫染色を行ったところ、心筋組織介在板におけるデスモグレイン 2 の発現は完全に欠損し、心筋細胞にお

ける空胞変性像やデスモゾーム関連タンパク質の異常沈着像を認めた。透過型電子顕微鏡を用いて微細構造を観察したところ、顕著な介在板の離開像を認めた。末梢血単核球から iPS 細胞を樹立し、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いて、HDR により変異を正常に修復したアイソジェニック iPS 細胞を作成した。これらの iPS 細胞を心筋細胞(CM)に分化させ、機能解析を行った。

(3) ゲノム編集技術を駆使した精密なヒト疾患 iPS 細胞アレル改変及び分化心筋病態解析

我々は、マウス成獣心臓組織において効率的に HDR を誘導した AAV による遺伝子導入が、ヒト iPS 分化心筋においても同様に HDR を促進するのかを検証した。ヒト *MYL2* 遺伝子 3' 末端のストップコドン周辺を対象とするガイド RNA、及び同部位に対する相同配列で挟んだ tdTomato 蛍光タンパク質配列をコードする AAV2 を作成した (右図)。心筋症症例から樹立した iPS 細胞を、平面分化法を用いて心筋に分化させ、上述の AAV2 を用いて遺伝子導入を行った後、Cas9 を mRNA で導入することで HDR を誘導することを試みている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Suwa Yoshinobu, Higo Shuichiro, Nakamoto Kei, Sera Fusako, Kunimatsu Suzuka, Masumura Yuki, Kanzaki Machiko, Mizote Isamu, Mizuno Hiroya, Fujio Yasushi, Hikoso Shungo, Sakata Yasushi	4. 巻 60
2. 論文標題 Old-Age Onset Progressive Cardiac Contractile Dysfunction in a Patient with Polycystic Kidney Disease Harboring a PKD1 Frameshift Mutation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 220 ~ 225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1536/ihj.18-184	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 Miyawaki Hiroshi, Kioka Hidetaka, Sato Kazuaki, Kurashige Masako, Ozawa Takayuki, Shibayama Hirohiko, Hikoso Shungo, Morii Eiichi, Yamauchi-Takahara Keiko, Sakata Yasushi	4. 巻 59
2. 論文標題 Long-term Effects of the Janus Kinase 1/2 Inhibitor Ruxolitinib on Pulmonary Hypertension and the Cardiac Function in a Patient with Myelofibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 229 ~ 233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2169/internalmedicine.3528-19	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 Kojima Takayuki, Hikoso Shungo, Nakatani Daisaku, Suna Shinichiro, Dohi Tomoharu, Mizuno Hiroya, Okada Katsuki, Kitamura Tetsuhisa, Kida Hirota, Oeun Bolrathanak, Sunaga Akihiro, Kurakami Hiroyuki, Yamada Tomomi, Sakata Yasuhiko, Sato Hiroshi, Horii Masatsugu, Komuro Issei, Sakata Yasushi	4. 巻 125
2. 論文標題 Impact of Hyperglycemia on Long-Term Outcome in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The American Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 851 ~ 859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2019.12.034	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 Shibamoto Masato, Higo Tomoaki, Naito Atsuhiko T., Nakagawa Akito, Sumida Tomokazu, Okada Katsuki, Sakai Taku, Kuramoto Yuki, Yamaguchi Toshihiro, Ito Masamichi, Masumura Yuki, Higo Shuichirou, Lee Jong-Kook, Hikoso Shungo, Komuro Issei, Sakata Yasushi	4. 巻 60
2. 論文標題 Activation of DNA Damage Response and Cellular Senescence in Cardiac Fibroblasts Limit Cardiac Fibrosis After Myocardial Infarction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 944 ~ 957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1536/ihj.18-701	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16件（うち招待講演 10件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yuki Masumura, Suzuka Kunimatsu, Shuichiro Higo, Yasuaki Kohama, Mikio Shiba, Takumi Kondo, Masato Shibamoto, Seiji Takashima, Shigeru Miyagawa, Shungo Hikoso, Yasushi Sakata
2. 発表標題 Rapid Evaluation of Candidate Causal Gene Mutation using High-content Image Analysis Combined with Targeted Gene Disruption
3. 学会等名 AHA scientific sessions 2018 (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shuichiro Higo, Yuki Masumura, Shungo Hikoso, Yasushi Sakata
2. 発表標題 Genome Editing in Cardiomyopathy
3. 学会等名 European Society of Cardiology Congress 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuki Masumura, Shuichiro Higo, Shungo Hikoso, Seiji Takashima, Yasushi Sakata
2. 発表標題 Verification of novel molecular mechanism of cardiac hypertrophy via regulation of mRNA degradation
3. 学会等名 第2回BCVR
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村聡希, 肥後修一朗, 南口仁, 世良英子, 水野裕八, 國松鈴花, 志波幹夫, 高島成二, 彦惣俊吾, 坂田泰史
2. 発表標題 二度の心停止から蘇生され プラコフィリン2(PKP2)ハプロ不全が同定された 不整脈源性右室心筋症(ARVC)の一例
3. 学会等名 第221回日本内科学会近畿地方会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shuichiro Higo, Yuki Masumura, Shungo Hikoso, Yasushi Sakata
2. 発表標題 Medical Application of Genome Editing for Advanced Heart Failure
3. 学会等名 第83回日本循環器学会学術集会 プレナリーセッション
4. 発表年 2019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 ゲノム編集の重症心不全医療応用
3. 学会等名 第22回日本心不全学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 肥後 修一朗
2. 発表標題 Genome Editing Targeting Cardiovascular Disease
3. 学会等名 第83回日本循環器学会学術集会 モーニングレクチャー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Masumura, Shuichiro Higo, Takamaru Ishizu, Yasuaki Kohama, Mikio Shiba, Takumi Kondo, Satoshi Kameda, Hiroyuki Inoue, Tomoka Tabata, Satoki Nakamura, Seiji Takashima, Shigeru Miyagawa, Shungo Hikoso, Yasushi Sakata
2. 発表標題 High-content Image Analysis Combined with Genome Editing Clarifies the Role for Pkd1 as a Sarcoplasmic Reticulum Protein that Regulates Calcium Influx in Cardiomyocytes
3. 学会等名 第3回BCVR
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takamaru Ishizu, Shuichiro Higo, Yuki Masumura, Shungo Hikoso, Yasushi Sakata
2. 発表標題 Therapeutic and Diagnostic Application of Genome Editing for Advanced Heart
3. 学会等名 第3回BCVR (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuichiro Higo, Yuki Masumura, Shigeru Miyagawa, Shungo Hikoso and Yasushi Sakata
2. 発表標題 Generation of Human Disease Model for Personalized Medicine Targeting Intractable Cardiomyopathy
3. 学会等名 第36回 ISHR
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂田泰史
2. 発表標題 Acute Heart Failure - Contemporary Prevention and Management
3. 学会等名 第67回日本心臓病学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂田泰史
2. 発表標題 心不全にとって心房細動はどのような意味を持つか？
3. 学会等名 第23回日本心不全学会 ランチオンセミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂田泰史
2. 発表標題 2型糖尿病合併心不全患者に対する糖尿病治療薬の選択
3. 学会等名 第23回日本心不全学会 ランチョンセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuhi Sakata
2. 発表標題 Stress Cardiomyopathy
3. 学会等名 AHA Scientific sessions 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂田泰史
2. 発表標題 健康・寿命を科学する、とは
3. 学会等名 第54回日本成人病(生活習慣病)学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂田泰史
2. 発表標題 高齢者心不全の特徴と対策
3. 学会等名 第54回日本成人病(生活習慣病) ランチョンセミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 肥後修一朗	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 216
3. 書名 心不全のサイエンス ゲノム編集の難治性心筋症医療応用	

1. 著者名 肥後修一朗, 石津宜丸, 坂田泰史	4. 発行年 2018年
2. 出版社 日本臨牀社	5. 総ページ数 720
3. 書名 心不全 ゲノム編集	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 不整脈源性心筋症患者由来の多能性幹細胞およびその利用ならびに不整脈源性心筋症治療用医薬	発明者 肥後修一朗, 彦惣俊吾, 宮川繁, 澤芳樹, 坂田泰史	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020- 44996	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学 重症心不全内科治療学グループホームページ
http://www.cardiology.med.osaka-u.ac.jp/?page_id=33635

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 修一郎 (Higo Shuichiro) (00604034)	大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授 (14401)	
研究分担者	彦惣 俊吾 (Hikoso Shungo) (30423164)	大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401)	