

令和 3 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16518

研究課題名(和文)画像解析・ゲノム編集を組み合わせた難治性心筋症遺伝子変異の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism of genetic disorder in intractable cardiomyopathy using high-content imaging combined with genome editing

研究代表者

増村 雄喜(Masumura, Yuki)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：60793437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ハイコンテンツイメージングシステムを用いて、単細胞レベルで多検体の心筋細胞内カルシウム動態画像および蛍光免疫染色画像を組み合わせたイメージング解析法の開発を行った。マウス培養心筋細胞やヒトiPS分化心筋細胞を用いた計測を行い、得られたデータをリンクさせるMATLABプログラムを開発した。更にゲノム編集を用いて、分化後のiPS由来心筋細胞におけるサルコメアイメージング法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カルシウムは、心筋細胞において、興奮収縮連関の中心的役割を担う。本研究では、個々の心筋細胞レベルにおけるカルシウムの動態を、免疫染色で得られる画像情報と1対1でリンクさせ、自動解析するアルゴリズムを開発した。更に、ヒトiPS細胞由来分化心筋細胞を用いたサルコメアライブイメージング法を確立した。ゲノム編集技術や、疾患iPS細胞技術と組み合わせることで、遺伝性心筋症研究への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We developed the analytical system that combines calcium transient data with static immunostaining images in individual cultured cardiomyocytes obtained by high-content imaging system. We analyzed calcium transient data in murine cultured cardiomyocytes or in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (iPSC-CMs) and developed MATLAB program that links the obtained data. Finally, we developed sarcomere live-imaging system in iPSC-CMs using genome editing.

研究分野：循環器内科学

キーワード：ハイコンテンツイメージング カルシウム ゲノム編集

## 1. 研究開始当初の背景

難治性心筋症発症には遺伝的素因が強く関与し、高速シーケンス解析技術により多くの遺伝子変異を短時間で高精度で同定することが可能となった。しかし、心筋症発症や心不全の重症化には様々な分子病態メカニズムが関連しており、限られた時間において、個々の症例に適した治療法を選択するためには、遺伝子異常の同定のみならず、遺伝子変異と病態との関連性を迅速に解明していく手法の開発が急務である。カルシウム(Ca)は心筋細胞において、興奮収縮連関の中心的役割を担い、心筋の電氣的興奮や収縮性において重要な役割を担う。Ca 動態を検出する多くの方法論が確立されている一方、個々の心筋細胞ごとの解析や、個々の心筋細胞の染色による画像情報と Ca 動態をリンクさせ、包括的に解析する方法は十分確立されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、ハイコンテンツイメージングシステム(High Content imaging System ; HCS)を用いて、単細胞レベルで多検体の心筋細胞内カルシウム (Ca) 動態画像および蛍光免疫染色画像を組み合わせたイメージング解析法を開発し、更に CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を組み合わせることで、遺伝子変異の病原性の迅速な評価系を構築することを目標とした。具体的には下記4つの課題解決を設定し、心筋症の発症メカニズム、心不全の病態解明へとつなげ、個々の症例に適した治療法を選択・開発につなげることを最終目標に本研究を推進した。

1. ハイコンテンツイメージングシステムを用いた単細胞レベルの Ca 動態評価系の構築
2. ゲノム編集技術を用いた標的遺伝子変異の Ca 動態への関連の評価
3. 遺伝子変異に伴う Ca 動態の異常と心筋細胞の形態や遺伝子発現との関連性の評価
4. ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の Ca 動態評価および機能評価

## 3. 研究の方法

1. ハイコンテンツイメージングシステムを用いた単細胞レベルの Ca 動態評価系の構築

HCS を用いた単細胞レベルの Ca 動態評価系を構築し、細胞種特異的な細胞内 Ca 動態の変化や、薬剤応答性変化を評価し、心筋細胞における分子機能評価に活用する。

2. ゲノム編集技術を用いた標的遺伝子変異の Ca 動態への関連性の評価

ゲノム上の任意の場所の欠損や、独自に設計した遺伝子配列に書き換える遺伝子編集技術が確立しており、遺伝子変異を迅速・簡便に再現可能なため、原因候補遺伝子変異に伴う Ca 動態の変化を評価し、病原性を検証していく。

3. 遺伝子変異に伴う Ca 動態の異常と心筋細胞の形態や遺伝子発現との関連性の評価

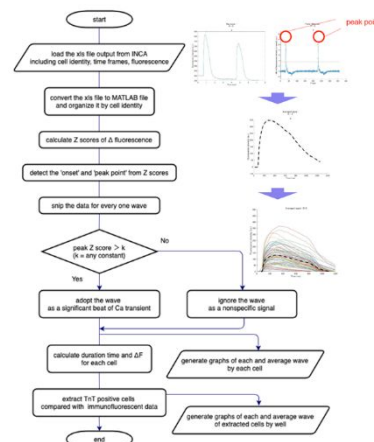
ゲノム編集技術による遺伝子変異の導入下に、HCS を用いて細胞内 Ca 動態の動的解析と蛍光免疫染色による細胞の形態や分子発現量などの静的解析を同一単一心筋細胞で行っていく。

4. ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の Ca 動態の評価および形態評価

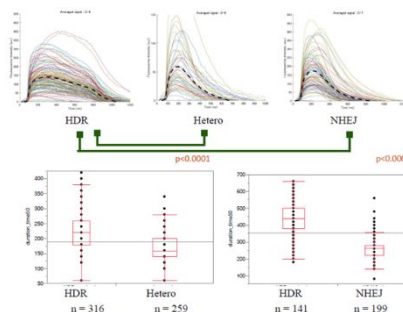
重症心筋症症例の臨床データおよびゲノムデータを蓄積しつつ、ヒト iPS 細胞の樹立を順次行い、分化心筋を用いて免疫蛍光画像解析と Ca 動態解析を組み合わせ、細胞種特異的な形態や分子発現の評価および Ca 動態を用いた機能評価や薬剤応答性評価を行っていく。

## 4. 研究成果

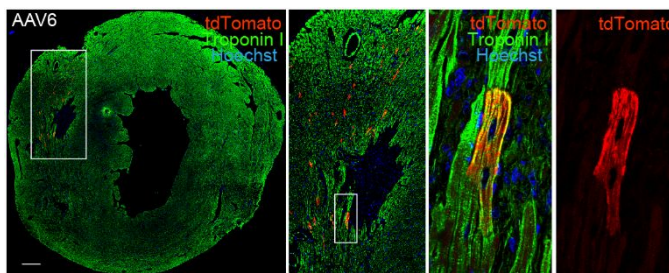
不整脈源性心筋症症例の末梢血単核球から iPS 細胞を樹立し、ゲノム編集を用いて変異を修復、あるいは両アレルにホモ接合型に変異を導入したアイソジェニック iPS 細胞セットを構築した。iPS 細胞から分化させた iPS 分化心筋細胞を、分化後 96 ウェルプレートに播種し、Fluo4-AM を添加しハイコンテンツイメージングシステム(IN Cell Analyzer 6000)を用いて Ca 動態画像を取得後、細胞を固定し染色画像を取得した。核周囲同心円上の Fluo4 の蛍光度変化、及びトロポニン T 蛍光度データを、核染色像を元にリンクさせ、数値計算ソフトウェア (MATLAB)を用いてトロポニン T 陽性細胞特異的な蛍光度波形を作成した(右図)。



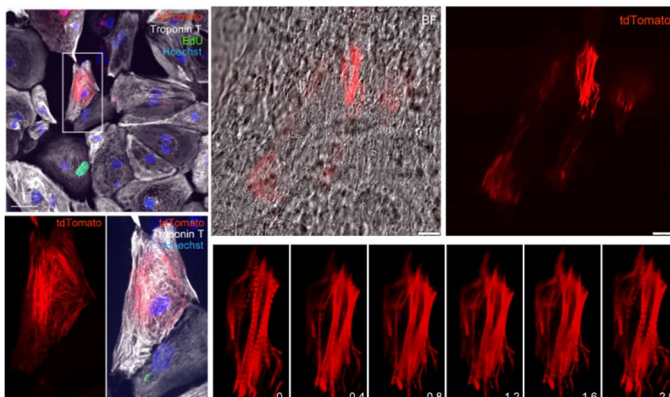
不整脈源性心筋症症例から樹立したアイソジェニック iPS 分化心筋を用いて解析したところ、数百個の心筋細胞における個々の Ca トランジェントデータを同時に取得することができ、変異分化心筋では Ca 減衰時間の短縮を認めた（右図）。今後、各疾患変異における分子動態とカルシウムデータをリンクさせた解析を継続していく予定である。



また、心筋細胞サルコメアイメージング解析系の確立のため、Cas9 ノックインマウス心筋細胞、及びヒト iPS 分化心筋細胞におけるアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いたゲノム編集による相同組み換え (HDR) 誘導の実験系確立を行った。ミオシン調節軽鎖タンパク質をコードする MyI2 遺伝子の 3' 末端に tdTomato 蛍光タンパク質をノックインするため、gRNA 及び修復テンプレート DNA を組み込んだ AAV を作成した。8 週例の Cas9 ノックインマウス成獣心臓組織の左室自由壁に AAV を投与すると、細胞周期 S 期侵入非依存的に、非分裂心筋細胞において HDR が生じることを見出した（右図）。



次いでこの方法を応用し、ヒト MYL2 遺伝子をターゲットとした tdTomato 蛍光タンパク質のノックインを試みた結果、S 期侵入を経ない iPS 分化心筋において、AAV による遺伝子導入により HDR が生じることを見出した。更に、シート状のヒト iPS 分化心筋細胞に対して AAV による遺伝子導入により直接 HDR を生じさせ、分化後の心筋細胞においてサルコメア収縮を可視化する系を確立し報告した（右図）。



確立したゲノム編集による実験系を用いて、HCS と組み合わせることで、HDR により蛍光標識された個々の心筋細胞における Ca 動態解析を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

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 15348
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

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 Targeted Gene Disruption Clarifies the Role for Pkd1 as a Sarcoplasmic Reticulum Protein that Regulates Calcium Influx in Cardiomyocytes
3. 学会等名 第3回日本循環器学会基礎研究フォーラム
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 Failure
3. 学会等名 第3回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2019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 ハイコンテントイメージング・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, 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 (国際心臓研究学会日本部会)
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------