

令和 3 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17515

研究課題名（和文）クロマチン制御とDNA修復応答に着目したラミン変異拡張型心筋症の病態解明

研究課題名（英文）Elucidation of disease mechanism of LMNA-mutant dilated cardiomyopathy focusing on chromatin remodeling and DNA damage response

研究代表者

伊藤 正道（Ito, Masamichi）

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：70794642

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）：本研究では予後が悪く、治療法が存在しないLMNA変異拡張型心筋症の病態を解明するため、該当する患者さんからiPS細胞を作成し、心筋細胞に分化させて様々な解析を行った。その結果、LMNA変異心筋細胞ではDNA損傷応答が亢進していること、電気的活動の異常などの表現型異常が見られることが分かった。さらに、これらの細胞を用いて網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、筋収縮線維の発現低下を認め、心筋成熟化障害が示唆された。さらに遺伝子発現の調節システムであるエピゲノムの解析を行ったところ、LMNA変異心筋では転写因子TEAD1の標的分子群の発現が低下していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はこれまでの先行研究で、DNA損傷蓄積と心機能低下の因果関係を示してきた。今回用いた患者由来iPS心筋細胞を用い、心筋細胞のDNA損傷を軽減する化合物をスクリーニングすることで新たなDCMの治療候補化合物を同定できる可能性がある。

また、今回の結果はTEAD1の標的遺伝子群の発現低下が心筋細胞の成熟化障害に関与している可能性を示唆しており、TEAD1遺伝子導入によって心筋細胞の成熟化誘導が可能であれば、心不全進行過程で見られる心筋細胞の幼若化を抑えることで、新しい心不全治療法を提唱できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, in order to elucidate the pathogenesis of LMNA-mutated dilated cardiomyopathy, which has a poor prognosis and for which there is no cure, we generated iPS cells from the patients with LMNA mutation and differentiated them into cardiomyocytes. We found that LMNA mutant cardiomyocytes showed phenotypic abnormalities such as enhanced DNA damage response and abnormal electrical activity. Furthermore, comprehensive gene expression analysis of these cells showed decreased expression of muscle contractile fibers, suggesting impaired myocardial maturation. Furthermore, analysis of the epigenome, a regulatory system for gene expression, suggested that the expression of a group of target molecules of the transcription factor TEAD1 was reduced in LMNA-mutant myocardium. These findings may lead to understanding of the pathogenesis of DCM and the development of new therapies.

研究分野：循環器病学

キーワード：特発性拡張型心筋症 iPS細胞 LMNA変異 心不全

## 1. 研究開始当初の背景

特発性拡張型心筋症 (dilated cardiomyopathy; DCM) は、進行性の心腔拡大と心機能低下を特徴とする原因不明の疾患で、心不全と致死的不整脈を合併する難病である。我々は、DCM 患者のうち約 10% を占める LMNA 変異を有する患者群の予後が特に悪いことを見医大している。LMNA は核膜を裏打ちするラミン A をコードし、核形態の維持に関与する。さらに、LMNA 変異により早老症 (Hutchinson-Gilford 症候群) を発症することから、ラミン分子の異常が DNA 損傷の蓄積や細胞老化を引き起こすことが報告されているが、心筋細胞においてなぜ LMNA 変異が収縮不全や伝導障害などの機能異常を引き起こすかの詳細な機序は明らかにされていない。

ラミン分子はインテグリンと結合し細胞外からのメカノストレスの核への伝搬に関与するのみならず、クロマチンを核膜辺縁に引き寄せて遺伝子発現を負に制御していることが知られている。また LMNA 欠損細胞では、DNA-PK や 53BP1 などの DNA 修復応答分子の発現の低下や遅延により細胞老化が引き起こされると報告されている。申請者は、ラミン分子がクロマチン構造を直接制御していることに着目し、ラミン機能不全によるエピゲノム変化が p53 シグナル、DNA 損傷応答異常などの不全心筋における変化の上流の分子機構ではないかと仮説を立て、LMNA 変異心筋細胞のエピゲノム・遺伝子発現解析を通じ疾患発症のメカニズムの検証を試みることにした。

## 2. 研究の目的

本研究では、LMNA 変異を有する心臓・心筋組織の遺伝子発現変化とエピゲノム変化とを網羅的に解析し、細胞・組織の機能異常と比較することによって DCM 発症のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) LMNA 変異 iPS 細胞由来心筋 (iPSCM) を用いた解析

先行研究で、LMNA 変異 (p. Q353R) を有する DCM 家系を同定し、iPS 細胞を樹立、iPSCM の分化誘導を行った。また、この iPS 細胞の責任変異をゲノム編集によって修復したコントロール株を作成し、これと比較しながら以下の検討を行った。

#### ①. 形態解析、DNA 損傷応答の解析

・誘導された心筋細胞の核形態を評価した。また、 $\gamma$ H2AX 陽性箇所を示される DNA 損傷の蓄積を定量評価した。

#### ②. 機能解析

・心筋細胞の収縮、電気的活動を解析するインピーダンス・フィールドポテンシャル計測機器を用いて機能的評価を行った。

#### ③. 遺伝子発現の変化

・RNA-seq によりデータを取得した。

#### ④. エピゲノム解析

・少数細胞からクロマチン免疫沈降を実施する CUT&RUN と言われる手法を用い、各ヒストン修飾に対する ChIP-seq のデータを取得した。

### (2) LMNA 変異マウスを用いた解析

ヒト p. Q353R 変異と相同な変異を有するノックインマウスを作成し、(1) と同様に形態・機能、遺伝子発現等の解析を行った。

## 4. 研究成果

LMNA p. Q353R 変異 iPS 心筋細胞の解析を行った結果、変異株はコントロール株と比較して核形態の変形が高度であることが分かった。また、変異株で  $\gamma$ H2AX 陽性箇所を示される DNA 損傷応答箇所が有意に増加していることが分かった。これらは患者検体で認められる異常を再現していた。

機能的解析では、疾患株で活動電位振幅の低下や興奮伝搬時間の延長などの異常が認められることが分かった。インピーダンスで示される収縮振幅の低下は明らかではなかった。

本研究では予後が悪く、治療法が存在しない LMNA 変異拡張型心筋症の病態を解明するため、該当する患者さんから iPS 細胞を作成し、心筋細胞に分化させて様々な解析を行った。その結果、LMNA 変異があると、心筋細胞では DNA の損傷が増えることが分かった。

た。

さらに、これらの細胞を用いて、遺伝子発現の網羅的解析を行ったところ、変異株の心筋細胞では一部の修復酵素の発現が低下していることが判明した。また、サルコメア分子・筋収縮繊維を構成する遺伝子群の発現が低下しており、心筋細胞の成熟化が障害されていると考えられた。

さらにこれらの細胞を用いて取得した H3K4me3 修飾の ChIP-seq データを解析したところ、LMNA 変異株で H3K4me3 修飾の peak が減少する領域が同定され、これらの領域は写因子 TEAD1 結合ドメインを共通して持つことが示唆された。

また、相同変異を持つマウスを作成したところ、これらのマウスは周産期致死を呈すること、胎児期 (E17.5) において心拡大と個体の成長障害を認め、核形態の不整を呈することが分かった。またこの胎仔の単一核 RNA-seq を実施したところ、変異 iPSCM と同様に未熟な遺伝子発現プロファイルを有していることが判明した。

以上より、LMNA 変異 DCM のメカニズムの一端として、DNA 損傷修復酵素の誘導不全、およびエピゲノム変化による TEAD1 標的遺伝子群の誘導不全を捉えることに成功した。今後はこれらの同定された疾患特異的分子病態に介入することによって、異常表現型の是正が得られるかを解析していく見込みである。これによってこれまででない、新規の DCM および心不全治療法を提唱できる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Masamichi Ito, Seitaro Nomura, Hiroyuki Morita, Issei Komuro	4. 巻 3;7:154
2. 論文標題 Trends and Limitations in the Assessment of the Contractile Properties of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes From Patients With Dilated Cardiomyopathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Cardiovasc Med .	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Ko T, Fujita K, Nomura S, Uemura Y, Yamada S, Tobita T, Katoh M, Satoh M, Ito M, Domoto Y, Hosoya Y, Amiya E, Hatano M, Morita H, Fukayama M, Aburatani H, Komuro I.	4. 巻 25;4(6)
2. 論文標題 Quantification of DNA Damage in Heart Tissue as a Novel Prediction Tool for Therapeutic Prognosis of Patients With Dilated Cardiomyopathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JACC Basic Transl Sci .	6. 最初と最後の頁 670-680
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Ito M, Morita H	4. 巻 62(2)
2. 論文標題 Titin Truncation Variant in Dilated Cardiomyopathy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int Heart J.	6. 最初と最後の頁 221-223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Masamichi Ito
2. 発表標題 Exploring drug candidates for LMNA-mutant dilated cardiomyopathy
3. 学会等名 The 3rd JCS Council Forum on BCVR（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masamichi Ito
2. 発表標題 Construction of a Screening System for Therapeutic Candidate Compounds for Dilated Cardiomyopathy Using iPS cell-derived Cardiomyocytes
3. 学会等名 第85回 日本循環器学会学術集会（国際学会）
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
---------------------------	-----------------------	----

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