

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03358

研究課題名(和文) 老化による心筋症変異ゲノム編集マウスの分泌小胞における全遺伝子解析

研究課題名(英文) Whole genome analysis in exosome from dilated cardiomyopathy occurred by aging

研究代表者

水上 洋一 (Mizukami, Yoichi)

山口大学・大学研究推進機構・教授

研究者番号：80274158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：老化によって遺伝子変異の頻度は急速に増加し心臓病や癌などの疾患が急速に増加する。これらの体細胞変異による疾患は、バイオプシーによって疾患組織を調べる以外に原因遺伝子の解明方法は存在しない。心筋症微量バイオプシーで全エクソン領域を遺伝子解析する技術を開発し、ゲノム編集技術での拡張型心筋症の再現に成功した。しかし、多くの個体では検出された体細胞特異は変異率が低く、ゲノム編集マウスでも拡張型心筋症は発症しなかった。疾患組織の遺伝子状態が分泌小胞に放出されることが明らかになった。心筋症再現マウスのexosome全遺伝子発現解析を実施したが、miRNAの解析では十分な遺伝子は検出されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓は24時間働き続けており、心拍数の多さが寿命に関係している。実際に加齢に伴って心筋症や不整脈など心疾患が増加している。しかし、加齢による後天的な孤発性心筋症は変異遺伝子を発現している組織を解析する以外に検出方法はない。少量しか採取できないバイオプシーでは変異遺伝子がある組織を採取することは非常に困難である。2種類の次世代シーケンサーを組み合わせ、報告のある遺伝子変異全てを網羅した変異検出カスタムパネルを作製し、後天的な新規心筋症変異遺伝子の解明に世界で初めて成功した。今後、心筋症再現動物モデルを用いて拡張型心筋症の血液に放出される遺伝子を網羅的に解析し疾患を特定するシステムを構築する。

研究成果の概要(英文)：The frequency of genetic mutations rapidly increases with aging, leading to a sharp rise in diseases such as heart disease and cancer. The elucidation of causative genes for these somatic mutation-induced diseases currently relies on examining diseased tissues through biopsy. We have developed a technique for gene analysis of the entire exonic region using small myocardial biopsies and successfully reproduced dilated cardiomyopathy in mice using genome editing technology. However, the detected somatic-specific mutation rate was low in many individuals, and the two genome-edited mice did not develop dilated cardiomyopathy. Recently, the genetic status of the diseased tissue has been released into secretory vesicles. Although we conducted a comprehensive gene expression analysis of exosomes from the cardiomyopathy-reproduced mice, the miRNA analysis did not detect sufficient genes.

研究分野：分子生物学

キーワード：拡張型心筋症 遺伝子 ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトは老化に伴い、様々な病気の発症頻度が急激に増加する。特にがん、心血管疾患などの成人病は老化に伴い急激に増え死因の上位を独占している。これらの疾患は、紫外線やストレスなどで染色体 DNA に変異や断裂が発生し、その修復能力が低下して発症する。後天的な体細胞変異によって生じた異常なタンパク質による機能異常が癌や心筋症など致死的な疾患を誘発している。このような体細胞変異によって発症した疾患は、免疫などによる細胞死以外は自然に治癒することは難しい。近年、変異遺伝子を認識する抗体医薬などが実用化され始めており、副作用のない治療を開始できるようになった。このため、これらの疾患の遺伝子変異を発見することが最も重要になっている。癌は変異蛋白質を発現した細胞が異常に増殖する疾患であり、バイオプシーで採取した癌組織の全ゲノム解析等が行われ大きな成果を出している。心臓は 24 時間働き続けており加齢の影響が出やすく、心拍数の多さが寿命に関係していると言われている。実際に加齢に伴って心筋症や不整脈など心疾患が増加している。これらの疾患は、DNA 変異が関与していることがわかってきており、遺伝性と後天的(孤発性)変異のケースがある。遺伝性の拡張型心筋症は親族の病歴や血液ゲノムの解析から疾患変異が解析されている。しかし、加齢による後天的な孤発性心筋症は変異遺伝子を発現している領域を DNA 解析する以外に検出方法はない。心筋細胞は癌のように DNA 変異が入った細胞が増殖することはない。心筋症で少量しか採取できないバイオプシーでは変異遺伝子がある組織を採取することは非常に困難である。研究代表者らは、2 種類の次世代シーケンサーを組み合わせ、過去に報告のある遺伝子変異全てを網羅した変異検出カスタムパネルを作製し、後天的な新規心筋症変異遺伝子の解明に世界で初めて成功した。しかし、バイオプシーサンプルには疾患変異が検出されないことも多く、新たな診断手法の開発が強く求められている。心臓は心筋細胞が同時に動くように常に同期しており、異常な機能性蛋白質が合成した場合、その異常収縮が細胞間伝達を介して他の細胞に伝達され疾患を誘発する。このためバイオプシーでは変異源の組織を採取しなければならないが、弱っている心臓から多くの組織を採取することは致命的になり変異同定は極めて難しい。心疾患は体調不良で受診し、24 時間心電図を装着しても装着時に症状が出なければ診断できない。確定診断が出る前に突然死するケースも多い。しかし、心臓疾患時に疾患周囲に血管が新生し、細胞死が観察されることから、心臓疾患特異的なシグナルが放出されていることが予想できる。そこで、心筋細胞モデルで細胞外分泌因子蛋白質を網羅的に同定し、150 種類のタンパクを同定した。さらに共に 200 リットルの大量の細胞上清からタンパク精製を行い、心筋梗塞モデルでの心筋細胞から放出される細胞生存因子の同定に成功した。近年、癌などでは細胞外に放出される小胞(Exosome/Ectosome)に細胞由来の遺伝子が含まれることが報告され miRNA が検出されている。心臓疾患でも特定の miRNA を標的にして研究し、exosome 内に miRNA が存在していたことが報告されたが、その全容は不明のままである。研究代表者らは、細胞外に放出された小胞を単離し 5ng 微量 RNA から全 RNA ライブラリー作製に成功し、次世代シーケンサーを用いて全遺伝子解析を行った。その結果、15000 種類の遺伝子を同定する技術(exosome-NGS)を確立した。また、マウスの卵管内の受精卵に対してゲノム編集する i-GONAD 法技術を開発し、日本人に特異的な拡張型心筋症変異マウスの作製に成功した。さまざまな心筋症再現動物モデルを用いて難病である拡張型心筋症の血液に放出される Exosome 内遺伝子を網羅的に解析し疾患遺伝子の変異と疾患を特定するシステムを構築する。

2. 研究の目的

既に確立している全ゲノム解析による変異遺伝子の同定技術と変異発現マウスの作製技術を組み合わせ、①心筋症の臨床サンプルから蛋白質をコードしているゲノム領域を全て解析し、遺伝子変異を同定する。②日本人特有の心筋症変異発現マウスを i-GONAD 法で作製する。③独自に開発した疾患マウスで生体内に放出される exosome 内の全遺伝子を網羅的に解析し疾患変異と関連性を解析する。④心筋症患者さんの血液からエクソソームを分離し、エクソソーム内全遺伝子発現を解析し組織変異との相関性を検証する。

研究代表者らは、心筋症バイオプシー0.2mg から微量 DNA を抽出し、蛋白質をコードしている全 DNA 配列の解析に成功した。24 名の心筋症の遺伝子解析を行い、1 名で日本人特有の新規拡張型心筋症遺伝子変異を発見した。3 名で既知の心筋症発症変異遺伝子を解明している。この変異によって心筋症を発症することを確認するため、動物体内で直接ゲノム編集を行う i-GONAD 法を確立し、2 週間前後でノックインマウスを作製する技術に成功した。ゲノム編集 1 回の組換え動物の作製確立は 13.5%と極めて高率に作製できている。さらにエクソソームの全遺伝子発現の解析技術を検討し、小胞内には長さの異なる RNA が多数存在することが明らかになったが、抽出した RNA 量が検出限界以下であり通常の次世代シーケンス解析では定量できなかった。そこで、1 分子ごとにランダムな配列を挿入する unique molecular identifiers(UMI)技術を取り入れ、わずか数十 pg の RNA から正確に発現解析ができる技術を確立し、予備試験の結果では DNA 修復に関わるシグナルが活性化されていた。心疾患での exosome 小胞内全遺伝子解析の報告は全くなく、独自に開発した新技術でこれまで解明されていなかった心筋症から放出される小胞内変異遺伝子シグナルを解明する。これらの技術は世界でも最も高度な技術であり、最先端の遺伝子解析技術で難病である拡張型心筋症の新たな分泌シグナルを解明し診断・治療へ応用する。

3. 研究の方法

実験方法(孤発性拡張型心筋症の診断とバイオプシー)

臨床患者さんの診断を行い、孤発性拡張型心筋症のバイオプシーを実施し、サンプルの保存を行う。すでに 30 以上の症例についてサンプルの準備が進んでおり拡張型心筋症に関する研究実績も多く、バイオプシー技術は確立されている。これまでに心筋症や不整脈など心臓疾患を発症することが報告されている 57 遺伝子の 2987 領域に対する独自のカスタムパネルを作製した。このマルチプレックス PCR で既知心筋症変異の 57 遺伝子全領域(2987 産物)98.3% をカバーする。

(ライブラリー調製)

精製したゲノム DNA50ng およびカスタムパネル(プライマーmix)を用いて Ion Ampliseq Library Preparation キットで PCR 増幅およびライブラリー作製を行う。

(ION S5 を用いた次世代シーケンシング)

Ion S5 (現有)Sequencing 200 Kit v2 及び 318 チップを用いて解析を行う。リファレンスはヒトゲノムを用いてマッピングを行う。これまでの結果ではサンプル当たり約 70 Mbp の塩基数および約 50 万のリード数が得られている。

(NovaSeq での大規模次世代シーケンス解析での新規心筋症原因遺伝子解析)

これまでに報告のある心臓疾患関連遺伝子に変異が発見されない場合は全エクソン配列を増幅させ、次世代シーケンサー NovaSeq で全エクソン解析を行う。

(データ解析)

次世代シーケンスデータは Partek Flow、Variant Caller、Genomics Work Bench を用いる。

(変異発現心筋の機能解析)

心収縮能力の測定は、これまでに確立した方法で行う。培養心筋を電気刺激後、5msec のスピードで細胞の縦横の大きさを測定することで収縮能力に換算し測定する。また、収縮機能はカルシウム取り込みと密接に関連していることから細胞内カルシウム濃度を測定する。

(GONAD 法による KO マウスの作製)

標的遺伝子に対する tracrRNA および crRNA を IDT に合成を依頼すると共に CAS9 タンパク質を購入する。発情期にあるマウスを交配させ、翌日にプラグを確認した後、プラグ確認日にチオペンタール麻酔下、背中側から卵巣を引き出し、卵管にキャピラリーを通してハイブリダイズした tracrRNA/crRNA と CAS9 タンパク質を注入する。注入直後に in vivo での電気穿孔法で卵管内に存在している受精卵に直接ゲノム編集を行う。その後、縫合し麻酔から覚めるまで保温する。この技術について大塚教授に直接指導を受けた結果、50%以上の割合で受精卵への遺伝子導入に成功した。これらの技術を用いて候補となっている疾患変異を発現するノックインマウスを作製し心筋症原因変異を解明する。

(小胞 exosome 内全遺伝子発現解析)

心筋症再現マウスの血液を採取し、exosome 膜上に発現している Tim4 タンパクを標的にし、カルシウム存在下で小胞を捕捉しキレート剤に溶出して精製する。精製した exosome から全 RNA を抽出し超音波破碎装置で RNA の長さを揃える。その後、片側にランダムな DNA 配列を挿入した UMI バーコード配列を挿入し、逆転写した後、PCR で増幅する。PCR 産物を次世代シーケンサーで解析し、Genomic Workbench で解析する。補正したデータは IPA pathway 解析で探索を行い、活性化経路を検証する。RNA-seq のデータを variant call して疾患組織特異的な変異と合致するか検証する。

(心筋症患者さんの exosome 解析)

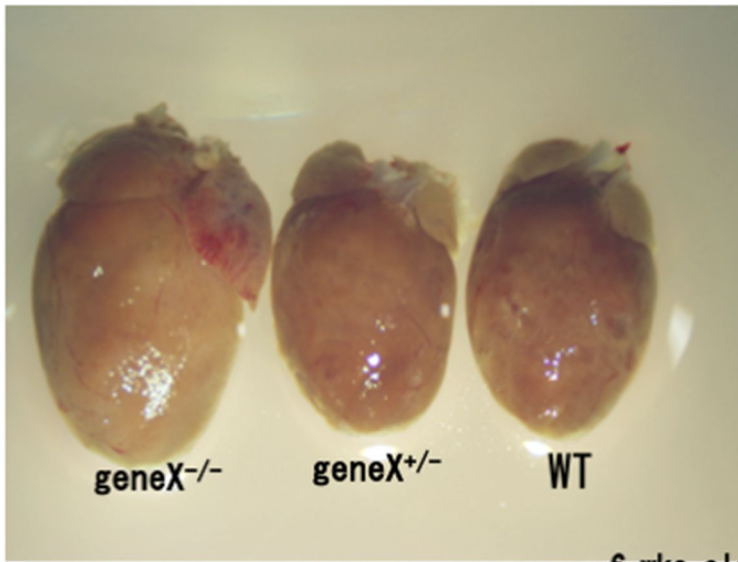
マウスと同様に血清から exosome を分離し、小胞内全遺伝子を分離する。分離した miRNA や long RNA が混在している分画を超音波破碎機で長さを揃え、ライブラリーを作製後に次世代シーケンサーで全遺伝子発現を解析する。同時にバイオプシーで分離した組織から全エクソン配列および全 RNA 配列を次世代シーケンサーで解析し exosome との相関を多変量解析の主成分分析および階層型クラスター分析で解析しマーカーとなる遺伝子群を pathway 解析する。

4. 研究成果

老化によって遺伝子変異の頻度は急速に増加し心臓病や癌などの疾患が急速に増加する。

これらの体細胞変異による疾患は、バイオプシーによって疾患組織を調べる以外に原因遺伝子の解明方法は存在しない。心筋症微量バイオプシーで全エクソン領域を遺伝子解析する技術を開発し、マウス個体ゲノム編集技術での拡張型心筋症の再現に成功した。しかし、多くの個体では検出された体細胞特異は変異率が低く、作製した 2 例のゲノム編集マウスでも拡張型心筋症は発症しなかった。疾患組織の遺伝子状態が分泌小胞に放出されることが明らかになった。心筋症再現マウスの exosome 全遺伝子発現解析を実施したが、miRNA の解析では十分な遺伝子は検出されなかった。

geneX^{-/-} マウスの心臓



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 1件）

1. 著者名 Shimizu Fumitaka, Ogawa Ryo, Mizukami Yoichi, Watanabe Kenji, Hara Kanako, Kadono Chihiro, Takahashi Toshiyuki, Misu Tatsuro, Takeshita Yukio, Sano Yasuteru, Fujisawa Miwako, Maeda Toshihiko, Nakashima Ichiro, Fujihara Kazuo, Kanda Takashi	4. 巻 9
2. 論文標題 GRP78 Antibodies Are Associated With Blood-Brain Barrier Breakdown in Anti-Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Antibody-Associated Disorder	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 e1038 ~ e1038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/NXI.0000000000001038	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 Xu Wenxi, Watanabe Kenji, Mizukami Yoichi, Yamamoto Yoshinari, Suzuki Takuya	4. 巻 712
2. 論文標題 Hydrogen sulfide suppresses the proliferation of intestinal epithelial cells through cell cycle arrest	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 109044 ~ 109044
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2021.109044	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 伊賀瀬雅也、岩谷 直、酒井 和紀、渡邊 健司、水上 洋一、水野 拓也
2. 発表標題 犬のリンパ球における5-アミノレブリン酸のIL-17産生増強作用
3. 学会等名 第164回日本獣医学会 学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 A. Nakatsuka, T. Esumi, Y. Mizukami, K. Watanabe and H. Itamura
2. 発表標題 Transcriptome analysis in the pulp of 'Saijo' persimmon during storage at low temperature
3. 学会等名 VII International Symposium on Persimmon 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武藤 潤、福田 信治、 渡邊 健司、水上 洋一、 佐山 浩二
2. 発表標題 高濃度トレハロースを用いた自家細胞由来3次元皮膚シート作製法開発
3. 学会等名 第120回日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊 健司、山本 滋、 前田 訓子、坂口 修一、 諫山慧士朗、岡 正朗、 永野 浩昭、水上 洋一
2. 発表標題 乳癌組織で検出された転写抑制因子SIN3A変異体は核外移行し エストロゲン受容体を増加させ増殖を促進する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 諫山慧士朗、渡邊 健司、 坂口 修一、村田 智昭、 水上 洋一
2. 発表標題 加齢に伴って変化する子宮遺伝子群のトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
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	諫山 慧士朗 (Isayama Keishiro) (30780887)	山口大学・大学研究推進機構・助教 (15501)	

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
研究分担者	森本 幸生 (Morimoto Sachio) (50202362)	国際医療福祉大学・福岡保健医療学部・教授 (32206)	
研究分担者	渡邊 健司 (Watanabe Kenji) (50711264)	山口大学・大学研究推進機構・助教 (15501)	
研究分担者	大塚 正人 (Otsuka Masato) (90372945)	東海大学・医学部・教授 (32644)	
研究分担者	小林 茂樹 (Kobayashi Shigeki) (90397993)	山口大学・医学部・教授(連携講座) (15501)	

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