

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16082

研究課題名(和文) ラミン変異拡張型心筋症の治療候補化合物の探索と薬効機序の解明

研究課題名(英文) Exploring therapeutic candidate compounds for LMNA-mutant dilated cardiomyopathy

研究代表者

伊藤 正道 (Ito, Maamichi)

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：LMNA変異拡張型心筋症(DCM)は進行性の経過を示し、予後が悪いことが知られている。我々はLMNA p.Q353R変異DCM患者から樹立したiPS細胞由来心筋細胞を用い、DCM心筋細胞に蓄積するDNA損傷を軽減する化合物を探索することによって新規治療候補化合物を同定することを目指した。その結果、vitamin D2(VD)に変異心筋細胞のDNA損傷を軽減する効果があることが判明した。遺伝子発現解析の結果、VDは心筋細胞のDNA修復酵素の発現を上昇させることが判明した。またLMNA Q353R変異タンパクはVDの受容体であるVDRと結合することにより、その転写活性を抑制することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって難病である特発性拡張型心筋症の新たな治療薬候補を提示することができた。同定されたvitamin Dは安全性が確立されている既存薬であり、drug repositionを目指した臨床試験のシーズとなる可能性がある。

また本研究の手法は心筋症のヒト変異iPS細胞由来心筋細胞を用いたスクリーニングの成功例として他変異の心筋症や疾患に応用できる可能性があり、個別化医療およびiPS創薬の1成功例として資するものである。

研究成果の概要(英文)：Dilated cardiomyopathy (DCM) with LMNA mutation is known to be associated with a progressive course and poor prognosis, but no specific treatments are available. We aimed to identify novel candidate compounds for the treatment of LMNA-mutant DCM by using iPS cell-derived cardiomyocytes established from patients with LMNA p.Q353R mutation, searching for compounds that reduce DNA damage accumulation in cardiomyocytes.

As a result of screening, vitamin D2 (VD) was found to be effective in reducing DNA damage in the LMNA mutant cardiomyocytes. Gene expression analysis revealed that VD upregulated the expression of several DNA repair enzymes in cardiomyocytes. In addition, LMNA Q353R mutant protein was found to repress the transcriptional activity of VD by binding to its receptor, VDR. Our findings provide a new seed for treatment of LMNA-mutant cardiomyopathy.

研究分野：循環器内科学

キーワード：拡張型心筋症 化合物スクリーニング LMNA変異 iPS創薬 iPS細胞由来心筋細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ラミン遺伝子(LMNA)変異は、進行性で薬物療法不応の難病 拡張型心筋症(DCM)を引き起こすが、病態に根差した治療法や発症予防法は開発されていない。

薬物療法やデバイス治療の進歩に伴って心不全患者の予後は改善したが、一部の拡張型心筋症 (dilated cardiomyopathy, DCM) の患者はこれらの治療に応答せず不良な転帰をとる。DCM は本邦における心移植導入の原因疾患の約 3/4 を占める難病で、その治療法開発は重要な課題である。以前我々は、DCM 患者の中で 10%を占める LMNA 変異を有する患者群は、内科的治療に応答せず特に予後が特に悪いことを報告した(Sci Rep 2018)。また、DCM 患者 60 名の診断時の心筋生検検体を用いた解析の結果、心筋細胞の DNA 損傷程度 (マーカーである poly(ADP-ribose)の免疫染色により評価)が高い患者群ほど、既存治療に応答せず臨床的予後が悪いことを報告した (JACC Basic Transl Sci, 2019;)。さらに、所属研究室での基礎的な先行研究では、圧負荷モデルマウスの心臓では心筋細胞の DNA 損傷が蓄積していること、同モデルのマウスで DNA 損傷応答誘導分子である Atm をノックアウトすることで心機能悪化をレスキューできることが判明した(Nat Commun 2017)。これらの知見は、心不全において DNA 損傷およびその応答亢進が心機能低下の原因であることを示唆している。

以上の知見に加え、申請者は先行研究で、LMNA 変異を有する DCM 患者から iPS 細胞を作成し、心筋細胞 (iPS 細胞由来心筋細胞、iPSCM) に分化させて細胞の特性を解析してきた。その結果、LMNA 変異株では変異修復コントロール株と比較して高度に DNA 損傷が蓄積していることを見出した。以上から、LMNA 変異心筋症において「DNA 損傷を軽減する介入できれば心不全の機能低下を防ぎ、予後改善できるのではないか」と着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、LMNA 変異 DCM に有効な治療候補化合物を開発することである。そのために、すでに作成した LMNA 変異 iPSCM を用い、細胞の DNA 損傷を軽減する化合物を同定する化合物スクリーニングを行う。また、スクリーニングの結果得られた化合物の薬効解析を通じ、LMNA 変異によって心筋細胞に DNA 損傷が蓄積するメカニズム、および DNA 損傷が心機能低下をもたらすメカニズムの理解に役立つ知見を得る。

3. 研究の方法

(1)心筋細胞を用いたスクリーニング系

・ LMNA p.Q353R 変異を有する DCM 患者から作成した iPS 細胞を分化させ、iPSCM を作成しストックする。iPSCM を培養後、化合物ライブラリを作用させて、固定後、DNA 二重鎖切断マーカーである H2AX の免疫染色を行うことで、DNA 損傷程度を定量評価した。染色像をハイコンテントイメージング機器 (PerkinElmer, Operetta) にて撮影し、H2AX の陽性箇所を核内のドットとして検出、カウントするアルゴリズムを作成した。投薬後のカウントとコントロールとを比較し、薬効を定量的に評価した。3 週のスクリーニング実験を行い、平均値で薬効を評価した。

・ 市販の化合物ライブラリである Selleck DNA damage and repair library(175 化合物)を用いて、ヒット化合物を探索した。

(2)ヒット化合物の機能解析；

・ 同定した化合物が実際に心機能異常をレスキューできるか確認するため、iPSCM で作成した心筋組織や、LMNA 変異マウス(p.Q353R, R225X)に投与することで、化合物が収縮能・心機能に与える影響を解析した。

(3)ヒット化合物の薬効機序の検証；

投薬後の遺伝子発現変化を網羅的に解析することで、ヒット化合物が薬効を発揮するメカニズムの解明を目指した。また、今回対象とした LMNA p.Q353R 変異タンパクの結合スクリーニングによって疾患発症のメカニズムの解明を目指した。

4. 研究成果

・ DCM 患者由来 iPS 細胞のゲノム編集によって当該変異を修復した isogenic control 株を作成し実験の対照とした。LMNA 変異株と修復株の特性比較を行ったところ、変異株では核形態の高度な変形に加え、収縮力の低下を認めた。さらに疾患株では核内で DNA 二重鎖切断マーカーである H2AX の陽性箇所が増加していた。以上から DNA 損傷蓄積を含む疾患特性のモデリングが実現されていることが判明した。

・そこで変異株を用い、H2AX の集積を軽減させる化合物のスクリーニングを行った結果、vitamin D2 (VD2) が変異株の DNA 損傷を有意に軽減させ、効果には濃度依存性・クローン間再現性があることが分かった。この VD2 の有効性の機序を解明するために修復株・疾患株・投薬後疾患株の RNA-seq によって発現変動遺伝子を探索したところ、VD2 は疾患株で低下している複数の DNA 修復酵素の発現を回復させることが判明した。

・今回対象とした LMNA p.Q353R 変異が DNA 損傷蓄積を来す機序を探るため、protein array (Filgen) を用いて変異 LMNA p.Q353R タンパクと野生型 LMNA タンパクの結合分子のスクリーニングを実施し、変異によって結合性が変化する分子を探索した。その結果、変異型タンパクでは野生型に比して、vitamin D 受容体 (VDR) との結合性が有意に増強していることが判明した。変異心筋細胞では VDR が核膜辺縁に局在しており、レポーターアッセイでは VDR の転写活性が低下していることが分かった。

・最後に *in vivo* における VD2 の DNA 損傷蓄積、心機能に対する効果を検証した。圧負荷心不全モデルマウス、Lmna ナンセンス型変異心筋症モデルマウスの 2 つのモデルで VD2 analog は DNA 損傷の蓄積を軽減させ、心機能を改善させた。

DNA 損傷蓄積は生活習慣病を含む様々な心不全に共通する分子機序の 1 つとして注目されているが、どのようにこれを予防し心機能低下を回避するかは明らかになっていない。本研究のように患者由来 iPS 細胞を用いることで、疾患組織におけるさまざまな病的プロセスの再現が可能であるばかりでなく、化合物スクリーニングを通じて治療候補化合物の同定を目指すことができる。今回のスクリーニングでは既存薬の 1 つである VD2 がヒットしており、drug repositioning を目指した臨床試験が期待される

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 伊藤正道	4. 巻 283-14
2. 論文標題 循環器病領域における疾患iPS細胞の臨床応用のこれまでとこれから	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1432 - 1437
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 無
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 Yamada S, Ko T, Ito M, Sassa T, Nomura S, Okuma H, Sato M, Imasaki T, Kikkawa S, Zhang B, Yamada T, Seki Y, Fujita K, Katoh M, Kubota M, Hatsuse S, Katagiri M, Hayashi H, Hamano M, Takeda N, Morita H, Takada S, Toyoda M, Uchiyama M, Ikeuchi M, Toyooka K, Umezawa A, Yamanishi Y, Nitta R, Aburatani H, Komuro I.	4. 巻 14;9(15)
2. 論文標題 TEAD1 trapping by the Q353R-Lamin A/C causes dilated cardiomyopathy.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	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） 10.1126/sciadv.ade7047. Epub 2023 Apr 14	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 Sato T, Ito M.	4. 巻 85(5)
2. 論文標題 Fibroblast-Cardiomyocyte Interaction in Pediatric Restrictive Cardiomyopathy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circ J.	6. 最初と最後の頁 687-689
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circj.CJ-21-0100. Epub 2021 Mar 6.	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） 10.1536/ihj.21-053.	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 Nakagama Y, Ito M.	4. 巻 86(1)
2. 論文標題 Towards Deeper Phenotyping of the Dilated Cardiomyopathies in Children - Where Are We Now, and Where Are We Heading?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circ J.	6. 最初と最後の頁 116-117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.21-053.	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 Miura K, Matsuura K, Yamasaki Itoyama Y, Sasaki D, Takada T, Furutani Y, Hayama E, Ito M, Nomura S, Morita H, Toyoda M, Umezawa A, Onoue K, Saito Y, Aburatani H, Nakanishi T, Hagiwara N, Komuro I, Shimizu T.	4. 巻 63(2)
2. 論文標題 Functional Evaluation of Human Bioengineered Cardiac Tissue Using iPS Cells Derived from a Patient with Lamin Variant Dilated Cardiomyopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int Heart J.	6. 最初と最後の頁 338-346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.21-790.	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, Kato M, Sassa T, Ko T, Fujita K, Yamada S, Miura K, Toyoda M, Takada S, Tobita T, Katagiri M, Kubota M, Yamada T, Hatsuse S, Morita H, Ikeuchi M, Matsuura K, Umezawa A, Nomura S, Aburatani H, Komuro I	4. 巻 -
2. 論文標題 LMNA p.Q353R mutation causes dilated cardiomyopathy through impaired vitamin D signaling	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Circulation	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) なし	査読の有無 無
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 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Masamichi Ito
2. 発表標題 Impaired Vitamin D Signaling Causes LMNA Mutation-related Cardiomyopathy
3. 学会等名 日本循環器学会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masamichi Ito
2. 発表標題 Disease modeling and drug discovery for LMNA-mutant dilated cardiomyopathy
3. 学会等名 日本循環器学会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東大病院プレスリリース 重症拡張型心筋症の病態を解明し新たな治療標的を同定
https://www.h.u-tokyo.ac.jp/press/_icsFiles/afieldfile/2023/04/17/release_20230417.pdf
 東京大学医学部附属病院循環器内科 研究部門 疾患iPS研究グループの研究内容
<https://cardiovasc.m.u-tokyo.ac.jp/study/ips/about>

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