

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15026

研究課題名(和文)エクソン・スキップ治療によるDMD患者iPS細胞由来心筋の機能の検討

研究課題名(英文)Functional evaluation of iPSC-derived cardiomyocytes in DMD patients by exon skip therapy

研究代表者

佐藤 充人(Sato, Mitsuto)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 遺伝子疾患治療研究部・流動研究員

研究者番号：10816630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：DMD遺伝子エクソン46-55欠失型DMD患者から樹立したiPS細胞を心筋細胞へ分化誘導し、エクソン45をスキップするアンチセンス核酸医薬(PMO)を用いてエクソン45-55欠失のイン・フレーム変異型に変換した。PMO容量依存性にエクソン・スキップが行われ、ジストロフィンタンパクの発現回復が得られた。また細胞内Ca²⁺イメージングにより、エクソン・スキップ前後で不規則な自発性細胞内Ca²⁺上昇の頻度低下(不整な収縮を呈する心筋細胞の減少)が確認され、Ca²⁺トランジェントの解析により、筋小胞体におけるCa²⁺動態の改善が示唆された。ジストロフィン回復はDMD心筋細胞のCa²⁺動態を改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DMD遺伝子エクソン46-55欠失DMD患者iPS細胞由来心筋細胞において、PMOを用いたエクソン45スキップにより、エクソン45-55欠失型に変換されてジストロフィンが回復し、心筋細胞の筋小胞体におけるカルシウム動態が改善することが示唆された。筋小胞体が関与した細胞内カルシウム濃度上昇は心室性不整脈の原因となることが報告されており、ジストロフィン回復によりそれらの致死性不整脈発生の抑制効果が期待される。本研究結果はDMD患者の約60%が変異を有するエクソン45-55領域をターゲットとしたマルチエクソン・スキッピング治療が、DMDの心筋障害に対しても有用である可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：We established induced-pluripotent stem cells (iPSCs) from T cells from a DMD patient carrying a DMD-exon 46e55 deletion, differentiated the iPSCs into cardiomyocytes, and treated them with phosphorodiamidate morpholino oligomers. The efficiency of exon-45 skipping increased in a dose-dependent manner and enabled restoration of the DMD gene product, dystrophin. Further, Ca²⁺ imaging analysis showed a decreased number of arrhythmic cells and improved transient Ca²⁺ signaling after exon skipping. Thus, the restoration of dystrophin expression may improve Ca²⁺ kinetics in DMD cardiomyocytes.

研究分野：神経科学

キーワード：デュシェンヌ型筋ジストロフィー 心筋 アンチセンス核酸医薬 エクソン・スキップ治療 カルシウムイメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) とエクソン・スキップ治療

DMD はジストロフィン遺伝子 (DMD 遺伝子) の変異により、筋形質膜に局在するジストロフィンが欠損し、進行性に骨格筋や心筋が侵される X 連鎖性疾患である。進行に伴い呼吸筋や心筋にも障害が加わるが、近年人工呼吸管理技術が向上したことにより呼吸不全での死亡が減少し、最大の死因は心不全となっている。DMD に対する最も有望な治療方法はアンチセンス・オリゴヌクレオチド(AO)を用いたエクソン・スキップ治療であり、pre mRNA から mRNA へのスプライシング過程で、遺伝子変異のあるエクソンを AO で強制的にスキップさせ、アミノ酸の読み枠を修正してジストロフィンの発現回復を行うことで症状の軽症化を目的とした治療法である。2016年9月にエクソン51をスキップするAOが米国FDAに認可された。

(2) エクソン 45-55 スキップ治療

本邦における筋ジストロフィー登録システム (Registry of Muscular Dystrophy) を基にした調査研究から、日本人 DMD 患者の遺伝子変異がエクソン 45~54 の間に多く集積していることが明らかとなっている (Nakamura H, et al. Orph J Rare Dis 2013)。これまでにエクソン 45-55 を欠失した患者では高 CK 血症はあるが無症状もしくは骨格筋障害が極めて軽度であることが報告されており (Nakamura A, et al. J Clin Neurosci 2008, Beroud C, et al. Hum Mutat 2007, Taglia A, et al. Acta Myol 2015)。このことはエクソン 45-55 が欠失したジストロフィン は正常ジストロフィンよりも短縮しているが、正常に近い機能を有していることを示唆している。我々はエクソン・スキップ治療で単純にジストロフィンを回復するだけでは症状の改善につながらず、適切なフレーム・シフトを行うことでより正常に近い機能を有したジストロフィンの発現回復を行うことができると考えた。エクソン 52 が欠失した DMD モデルマウスを用いてエクソン 45-55 スキップ治療を行いジストロフィンの発現回復と骨格筋の機能の改善が確認されている (Aoki Y, et al. PNAS 2013) が、心筋細胞においては、ジストロフィンの発現が回復することで心筋の機能的な改善、実際の心機能の回復につながるのかについては明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、DMD 患者心筋細胞に対してエクソン・スキップを行い、ジストロフィンの発現が回復することで、DMD 最大の予後規定因子である心筋の機能が回復するのかを細胞レベルで検討することである。対象として、DMD の典型的な臨床症状を呈するエクソン 46-55 欠失型の DMD 患者 (24歳・日本人男性) を選定した。14歳から車椅子、22歳で心不全兆候を認めていた。この患者の末梢血リンパ球より作成した iPS 細胞を心筋へ分化誘導し、AO を用いてエクソン 45 スキップを行い、理論的には軽症な臨床兆候を示すエクソン 45-55 欠失患者と同じ遺伝子欠失配列とすることで、心筋細胞の機能的な障害もより軽症化すると考えられる。iPS 細胞を用いることで患者特異的な心筋の表現型を細胞レベルで再現し、かつ細胞レベルでエクソン・スキップを行い、その有効性を評価する。

3. 研究の方法

本研究では、先行研究で作成し保有しているエクソン 46-55 欠失 DMD 患者の末梢血 T リンパ球より作成した iPS 細胞を分化誘導因子 (CHIR99021、Activin A、BMP-4、XAV939) を用いて心筋細胞へと分化誘導した。次に AO (phosphorodiamidate morpholino oligomers: PMO を使用) を用いてエクソン 45 スキップを行い、エクソン 45-55 欠失を誘導した。エクソン・スキップ前後で以下の項目を比較検討することを目的とした。

(1) 心筋細胞内カルシウムイメージングを用いた電気生理学的解析

高速共焦点レーザー顕微鏡およびカルシウム感受性蛍光プローブ (Fluo-4 AM) を用いた高速 Ca^{2+} 濃度測定法を用いて、各々の心筋細胞における自発性 Ca^{2+} トランジェントを比較検討した。

(2) Traction force microscopy を用いた力学的解析

心筋細胞の収縮力を評価する方法として、ゲル上に心筋細胞を培養し、心筋の収縮によって生み出されるゲルの歪みを、ゲルに包埋された蛍光ナノビーズの動きから計測する手法を用いた。蛍光顕微鏡を用いて撮像 (75 フレーム/s) したイメージから心筋の最大収縮期、最大弛緩期での蛍光ナノビーズの変位場を Particle image velocimetry (PIV) 法を用いて計算し、抽出された変位場のデータを Fourier transform traction cytometry (FTTC) 法を用いて再構成する (Tseng Q, et al. PNAS 2012)。traction force の平均値を比較し、心筋細胞の収縮能を評価することを目的とした。

(3) マイクロアレイでの網羅的遺伝子解析

AO 投与、非投与間でマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析を比較し、ジストロフィン回復による骨格筋、心筋に関連した遺伝子発現の変化、AO による他の遺伝子発現への影響を評価した。

4. 研究成果

(1) DMD 患者 iPS 細胞由来心筋細胞の作成とエクソン・スキップによるジストロフィン回復の確認

DMD 患者 iPS 細胞を心筋細胞へ分化誘導を行い (Day 0)、分化誘導後 Day 8~10 で細胞に自発

的な拍動が認められた。免疫細胞染色でトロポニン T および I の発現が認められ、FACS 解析では 60% 弱の細胞にトロポニン T の発現を認めた (図 1)。心筋分化誘導後 Day13 でエクソン 45 スキップを誘導する PMO を 48 時間インキュベーションし (Endo-porter を併用) Day 20 でエクソン 45 スキップ効率を RT-PCR で評価した。統計学的有意差は得られなかったものの PMO 容量依存性にエクソン 45 スキップが行われる傾向が認められた (PMO 5 μ M 40%, 10 μ M 55%, $p=0.25$) (図 2)。Day 40 でウェスタンブロッティング及び免疫細胞染色を行い、インフレーション化し短縮したジストロフィンタンパクの発現回復が確認され (図 3) 患者 iPS 細胞由来心筋細胞において PMO によるエクソン・スキップでジストロフィン回復が得られることを確認できた。

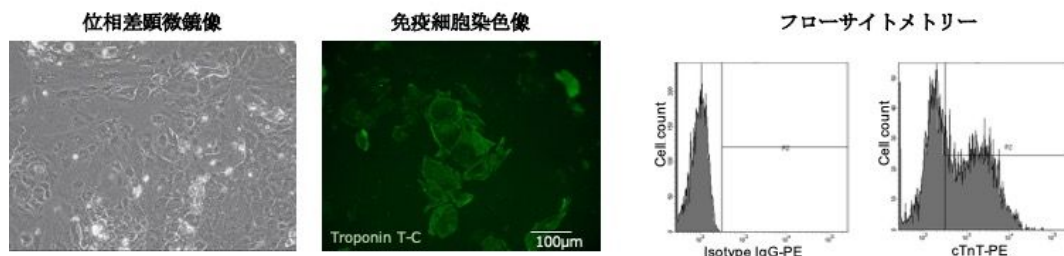


図 1 . DMD 患者 iPS 細胞の心筋細胞への分化誘導

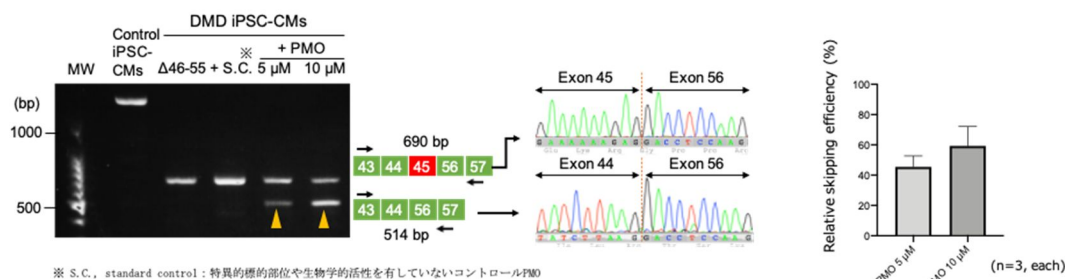


図 2 . PMO による心筋細胞のエクソン 45 スキップ効率の評価

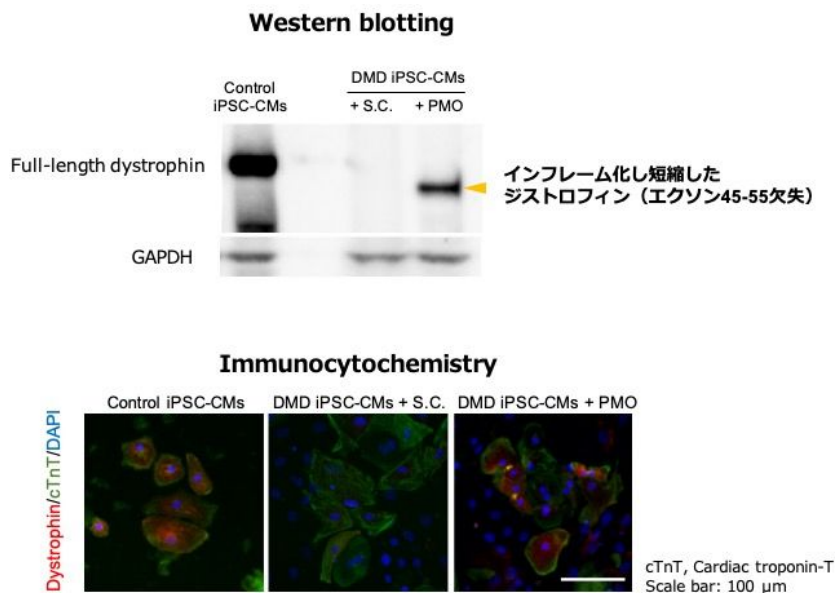


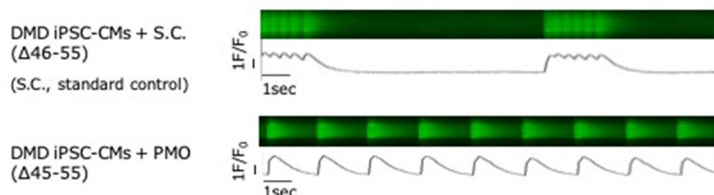
図 3 . エクソン・スキップによる心筋細胞のジストロフィン発現回復

(2) Ca^{2+} イメージングによる心筋細胞内 Ca トランジェント評価

次に、Fluo-4 AM を用いた細胞内 Ca^{2+} イメージングを行い、ジストロフィン回復による細胞内 Ca^{2+} トランジェントの変化を観察した。分化誘導後 Day 20 で PMO (10 μ M) を投与し、Day 60 において、シングルセルとした PMO 非投与群、PMO 投与群の心筋細胞での Ca^{2+} トランジェントを比較した。エクソン・スキップされた PMO 投与群の心筋細胞では、不規則な自発性細胞質内 Ca^{2+} 上昇の頻度低下、すなわち不規則な収縮を呈する心筋細胞の減少が認められた (PMO 非投与群 69.0%,

PMO 投与群 32.0%, $p < 0.01$) (図 4)。また 1/3Hz ペーシング下の心筋細胞における細胞内 Ca^{2+} トランジェントに関連する各パラメータ評価した結果、エクソン・スキップ後の心筋細胞では time to peak、 Ca^{2+} decay、transient duration の短縮 ($p < 0.01$) および Fluo-4 の蛍光強度変化 (F/F_0) の上昇 ($p < 0.01$) が認められた (図 5)。これらのパラメーター値の変化は、主に筋小胞体からの細胞質内 Ca^{2+} 放出および再取り込み機能の改善を示唆するものであり、ジストロフィン回復により細胞内 Ca^{2+} 動態の改善が示唆された。

Fluo-4 AMを用いた Ca^{2+} イメージング像



不規則な自発性細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を呈する細胞数

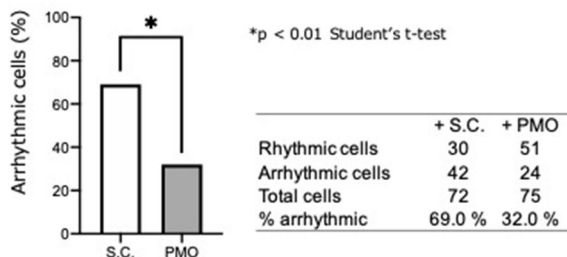


図 4 . 心筋細胞内 Ca^{2+} イメージング解析

1/3Hzペーシング下 Ca^{2+} トランジェント解析

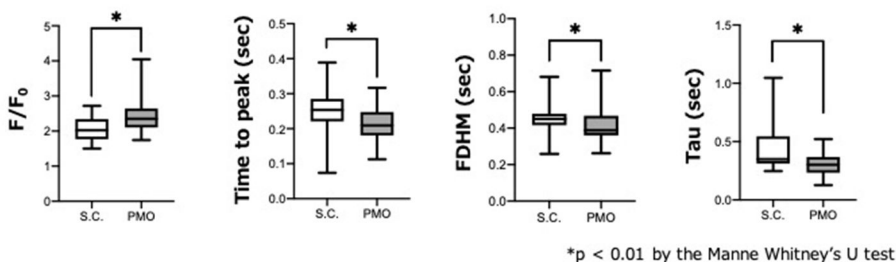


図 5 . Ca^{2+} トランジェント解析

(3) Traction force microscopy を用いた力学的解析

ジストロフィン回復により、心筋細胞の収縮力の変化を評価するために、Traction force microscopy を用いた力学的解析を計画した。ポリアクリルアミドゲルに蛍光ビーズを埋め込み、心筋細胞の収縮に伴って生じるビーズの平面変位を測定し、間接的に収縮力を評価する方法である。実現するにあたり、均一な弾性を有したゲルの作成、単一細胞でのゲル上の接着培養が課題となった。試行錯誤の結果、比較的均一なゲルの作成は可能となったが、単一心筋細胞での培養が難しく、集簇した細胞塊での評価となってしまい、この解析方法では実験ごとに感度と特異度が異なる結果が得られる可能性が高く、定量的に評価することができなかった。

(4) マイクロアレイ解析

PMO によるジストロフィンの発現回復により、遺伝子発現にどのような変化が生じるのか、マイクロアレイ解析データで GO 解析、パスウェイ解析を行った。エクソン・スキップ後、短期培養期間 (分化誘導 Day 20、PMO 投与 7 日後) では PMO 投与群、非投与群に遺伝子発現の変化は見

られず、PMO 投与による副次的な遺伝子発現は認めなかった。次に、PMO 投与後の長期培養期間 (Day40) での解析では、cardiac conduction、cardiac progenitor differentiation、calcium regulation in the cardiac cell のパスウェイで、PMO 投与群に遺伝子発現に変化が見られていたが、サンプル間での遺伝子発現にばらつきが大きく、有意な変化として検出することが困難であった。これは解析サンプルに心筋に分化した細胞と未分化の細胞が異なる比率で混在していることが要因と考えられた。傾向として、心筋細胞におけるカルシウム動態に關与する遺伝子発現の変化が推測され、ジストロフィン回復が心筋細胞でのカルシウム動態の改善に寄与する可能性が示唆された。

(5) まとめ

以上の結果から、DMD エクソン 46-55 欠失 iPS 細胞由来心筋に対してエクソン 45 スキップを行い、エクソン 45-55 欠失へと誘導することでジストロフィンの発現を回復し、心筋細胞内の Ca^{2+} 動態の改善が得られることを示した。ジストロフィン回復による Ca^{2+} 動態の改善の機序については明らかではないが、カルシウムイメージング等の結果から、ジストロフィン回復が筋小胞体における Ca^{2+} 動態の改善に寄与していることが考えられる。筋小胞体が關与した細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は心室性不整脈の原因となることが報告されており、ジストロフィン回復によりそれらの致死性不整脈発生の抑制効果が期待される。DMD 患者の約 60% がエクソン 45-55 領域内に変異を有し、またエクソン 45-55 を全て欠失した BMD は非常に症状の軽い臨床像を呈することが明らかとなっており、エクソン 45-55 領域全てを対象としたマルチエクソン・スキップ治療は多くの患者に適応され、かつ高い治療効果を得られる可能性がある。本研究結果はエクソン 45-55 領域のマルチエクソン・スキッピング治療が DMD の心筋障害に対しても有用である可能性を示唆している。現状では心筋細胞内のカルシウム動態の改善を確認し得たのみであり、今後は 3 次元心筋モデルによる心筋収縮能の評価、パッチクランプ法を用いたイオン電流、活動電位記録、DMD 心筋の筋小胞体における Ca^{2+} 動態の解明を行っていく必要がある。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sato Mitsuto, Shiba Naoko, Miyazaki Daigo, Shiba Yuji, Echigoya Yusuke, Yokota Toshifumi, Takizawa Hotake, Aoki Yoshitsugu, Takeda Shin'ichi, Nakamura Akinori	4. 巻 520
2. 論文標題 Amelioration of intracellular Ca ²⁺ regulation by exon-45 skipping in Duchenne muscular dystrophy-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 179 ~ 185
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.bbrc.2019.09.095	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤 充人
2. 発表標題 Exon 45 skipping therapy of iPS cells from a DMD patient with exon 46-55 deletion.
3. 学会等名 第59回 日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤 充人
2. 発表標題 DMD遺伝子exon46-55欠失変異を持つDMD患者iPSC由来心筋細胞に対するexon 45 skip治療に関する研究
3. 学会等名 第5回 日本筋学会学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----