

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16218

研究課題名（和文）高度に成熟した3D心筋組織を用いた HCMモデルの構築と発症機序の解明

研究課題名（英文）Construction and mechanics analysis of HCM model using matured 3D heart tissue

研究代表者

藤原 侑哉（Fujiwara, Yuya）

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：70842912

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）：肥大型心筋症（HCM）は心筋細胞の異常な肥大を呈する疾患であり、遺伝子変異が原因とされているが、その作用機序は不明である。申請者はiPS細胞由来3D心筋組織を成熟化させることで適切なモデルを作製し、それにより作用機序を解明することを目的とし、ERRgamma agonistと伸張培養により3心筋組織を成熟化させた。さらに、その方法により、MYH7 R719QとMYBPC3 G115*変異を有する3D心筋組織でHCMの表現系が顕在化された。またRNA-seqによりHCMで亢進するシグナル伝達経路を複数同定し、そのうちの一つを阻害する化合物により細胞の肥大を抑制する子が見えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥大型心筋症（HCM）はサルコメア関連遺伝子上の遺伝子変異が原因とされているが、その作用機序は不明であり、有用な治療法はない。そのため、本研究により、試験管内でHCMモデルを構築できたことは解析の簡便さを向上させることで、作用機序の解析を容易にし、また治療薬候補の評価にもつながるものである学術的に価値のある成果である。また本モデルにより、HCMに関与するシグナル伝達経路を同定できたことはHCMの疾患理解につながる社会的意義の大きい研究成果である。

研究成果の概要（英文）： Hypertrophic cardiomyopathy is a disease with hypertrophy of cardiomyocytes. Although genetic mutation cause HCM, the onset mechanisms are still unclear. We hypothesized that 3D heart tissues maturation manifest HCM phenotypes and these are enable to analyze onset of HCM.

3D heart tissues were matured by the combination with T112 and mechanical stretching. 3D heart tissues with MYH7 R719Q and MYBPC3 G115* were manifested HCM phenotypes by this maturation method. Moreover, using RNA-seq, we defined signal pathways which were up-regulated in HCM models and inhibition of one of the signal pathway decreased hypertrophic phenotypes.

研究分野：細胞生物学

キーワード：iPS細胞 iPS細胞由来心筋細胞 肥大型心筋症 人工組織 成熟化

1. 研究開始当初の背景

肥大型心筋症 (HCM) はサルコメア関連遺伝子上の遺伝子変異を主とした遺伝性疾患であり、サルコメアの異常やカルシウムハンドリングの異常が要因となり心筋の異常な肥大が生じ、死に至ることもある国の指定難病である。500 人に 1 人が罹患するとされているが、発症機序が明らかになっておらず、有効な治療薬はない。近年では、ヒト iPS 細胞由来 3D 心筋組織を用いた心疾患メカニズムの解明が期待されているが、未だ明確な HCM 発症機序の解明には至っていない。その理由として HCM の症状に關与するカルシウム誘導性カルシウム放出(CICR)や頻度依存性収縮予備能(FFR)などは成熟した心筋特有の細胞機能であるが、iPS 細胞由来 3D 心筋組織は未熟なためそれらの機能は保持していないことが考えられる。そのため、iPS 細胞由来 3D 心筋組織を用いて HCM 発症機序を解明するには CICR や FFR を示す成熟した 3D 心筋組織の構築法の確立が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

申請者らは心筋細胞成熟化を誘導する低分子化合物のハイスループットスクリーニングにより ERR gamma を主なターゲットとしたヒト iPS 由来心筋細胞を成熟させる新規な低分子化合物(T112)を見出しており (Miki et al. *Nature communications* 2021)、本化合物および作用機序の異なる伸展培養などの成熟化法を組み合わせることにより、HCM の表現型に關与する CICR や FFR を示す成熟度の高い 3D 心筋組織を構築することで HCM の発症機序を解明できるのではないかと仮説を立て、HCM の表現系が顕在化する 3D 心筋組織の成熟化法の確立を目的とした (図 1)。

さらに、疾患患者由来のヒト iPS 細胞を用いた場合、比較対象となる健常人と患者の細胞間で遺伝的背景 (ジェネティック・エピジェネティック) が異なることにより、特定の遺伝子変異による影響が同定できないことが考えられる。そのため、ジェネティック・エピジェネティックな影響を避けるために、CRISPER/Cas9 システムを用いて、HCM 変異を有する isogenic iPS 細胞を樹立し、用いることで、同一の遺伝的背景を持つ正常ヒト iPS 細胞株由来の 3D 心筋組織と詳細に解析・比較することにより、その発症メカニズムを明らかにすることを目指した (図 1)。

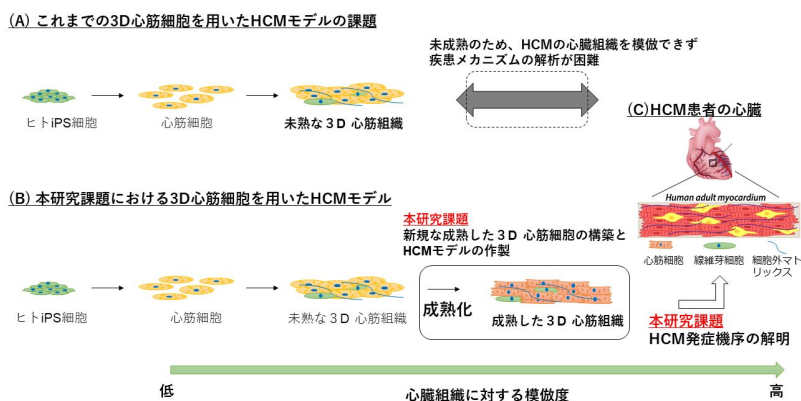


図1. これまでの3D心筋組織を用いた心疾患研究の問題点と本研究課題による解決法 (A) 従来の3D心筋組織の課題, (B) 本研究課題を目指す3D心筋組織, (C) HCM患者の心臓の模式図

3 . 研究の方法

これまで、成熟に伴い発現上昇する TNNI3 の遺伝子座に mCherry を組み込んだレポーターiPS 細胞を構築している。そのため、レポーターiPS 細胞を用いることで、mCherry を指標として、心筋細胞の成熟度を容易に検証できる。このレポーターヒト iPS 細胞から心筋細胞を作製し、3D 心筋組織を構築した。その後 T112 および伸張培養を行い、mCherry の発現を指標に 3D 心筋組織の成熟化に対して最適化を行った。その後 malignant および non-malignant な病原性変異を有する iPS 細胞を作製し、3D 心筋組織を構築したのち、HCM に関する表現系について評価をおこなった。HCM の表現系が確認されたのち RNA-seq により HCM 変異を有する 3D 心筋組織で亢進しているシグナル伝達経路を同定した。その後、同定されたシグナル伝達経路を阻害する化合物を用いて肥大抑制効果の検証をおこなった。

4 . 研究成果

ヒト iPS 細胞由来 3D 心筋組織の成熟化法の確立

初めに 3D 心筋組織に対する最適な T112 の濃度を得るため、mCherry の発現を指標に濃度依存的な T112 の効果を検証したところ、3uM の濃度で mCherry の発現が上限に達することが明らかとなった。さらなる成熟化を行うために、T112 存在下で伸張培養をおこなったところ、相加的に mCherry の発現が上昇することが示された。このことから T112 と伸張培養を組み合わせることにより、最も成熟化させることができると考えられたため、次にその他の成熟化の指標について調べた。その結果、細胞サイズやサルコメアの配向性は相加的に上昇することが明らかとなった。また、サルコメア長、収縮力については T112 に依存して上昇することが明らかとなった。また T112 と伸張培養の組み合わせにおいてのみ、解糖系が抑制され、ミトコンドリア量が増加することが明らかとなった。さらに RNA-seq より成熟化に関連する遺伝子群が上昇していたことから、T112 と伸張培養を組み合わせは形態や代謝、遺伝子発現プロファイルを成熟化方向に変化させていることが明らかとなった。

Malignant 病原性変異を有するヒト iPS 細胞由来 3D 心筋組織の樹立

成熟化された 3D 心筋組織で HCM の表現系が見られるかを検証するために、malignant な病原性変異で知られる MYH7 R719Q 変異を導入した iPS 細胞を作製した。MYH7 R719Q は正常な核型を示し、分化後に MYH7 の野生型と MYH7 R719Q の両方の mRNA を発現することを確認した。それを用いて 3D 心筋組織を作製したところ、細胞の肥大、過収縮、拡張障害は未熟な状態でも確認されたが、成熟化により解糖系の亢進、サルコメアの錯綜配列や繊維化などの表現系が顕在化されることが明らかとなった。

non-Malignant 変異を有するヒト iPS 細胞由来 3D 心筋組織の樹立

malignant な病原性変異は HCM の表現系を示しやすいことが考えられるため、次にこの成熟化方法により non-malignant な病原性変異を有する 3D 心筋組織で HCM の表現系が示されるかを検証した。non-malignant な病原性変異として MYBPC3 G115* 変

異を導入した iPS 細胞を作製した。作製された iPS 細胞は正常な核型を示し、分化後に MYBPC3 の発現量が減少することを確認したのち、それを用いて 3D 心筋組織を作製したところ、未熟な状態では細胞の肥大が確認されなかったが、成熟化により細胞の肥大、拡張障害や繊維化などの表現系が顕在化されることが明らかとなった (図 2)

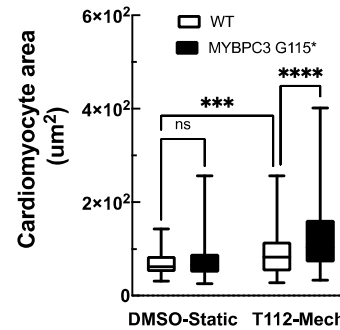


図2 MYBPC3 G115*は成熟化されることにより肥大する

HCM 発症機序の解明

野生型および MYH7 R719Q 変異、MYBPC3 G115* 変異を有する 3D 心筋組織から RNA を抽出し、RNA-seq により HCM 変異により発現亢進している遺伝子群を抽出した。その中から、データベースより実際の HCM 患者でも発現亢進している遺伝子群について抽出し、GO (gene ontology) 解析や KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 解析等を行い、HCM において亢進しているシグナル伝達経路を複数同定した。その中の一つのシグナル伝達経路を阻害する化合物を 96 well plate に播種した iPS 細胞由来心筋細胞に添加したところ、野生型では細胞の大きさに変化はなかったが、MYH7 M719Q においてのみ肥大化抑制が見られる化合物を同定した。このことから同定されたシグナル伝達経路は心筋細胞の肥大に関与している可能性が考えられる。一方で化合物による細胞毒性が見られたことから、毒性による細胞サイズの低下が否定できないため、今後はさらなる最適化をおこなっていく予定である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Fujiwara Yuya, Deguchi Kohei, Miki Kenji, Nishimoto Tomoyuki, Yoshida Yoshinori	4. 巻 2320
2. 論文標題 A Method for Contraction Force Measurement of hiPSC-Derived Engineered Cardiac Tissues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 171 ~ 180
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-1484-6_17	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 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuya Fujiwara
2. 発表標題 ERR gamma agonist under mechanical stretching manifests hypertrophic cardiomyopathy phenotypes of engineered cardiac tissue through maturation
3. 学会等名 第87回 日本循環器学会 学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuya Fujiwara, Kohei Deguchi, Masako Sasaki, Yuki Naka, Kenji Miki, Tomoyuki Nishimoto, Yoshinori Yoshida
2. 発表標題 Development of matured hiPSCs-derived 3D cardiac tissue using ERR agonist and mechanical stress and application for Hypertrophy cardiomyopathy (HCM) model.
3. 学会等名 ESC Congress 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞特性検出用デバイス及び細胞特性検出セット	発明者 藤原 侑哉, 吉田 善紀, 舩岡創平, 佐倉 武司	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-064450	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------