

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21602

研究課題名（和文）個別化医療を目的としたヒト不整脈源性右室心筋症モデル細胞の樹立と病態解明

研究課題名（英文）Development of Human Disease Model of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy for Personalized Medicine

研究代表者

坂田 泰史（Sakata, Yasushi）

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00397671

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究開発では、不整脈源性心筋症症例からiPS細胞を樹立し、ゲノム編集技術を用いて、発症原因であるPKP2遺伝子変異を精密に改変した細胞を作製した。作製したiPS細胞をシート状に拍動する心筋細胞に分化させ、機能を解析した結果、PKP2タンパク質の減少に伴い、収縮力が低下すること、デスモゾームの形成異常が生じることを見出した。さらに、ゲノム編集を用いて、生きた細胞においてデスモゾーム動態を可視化するiPS分化心筋細胞を構築した。この細胞にアデノ随伴ウイルスによるPKP2遺伝子補充を行い、デスモゾーム回復過程を可視化するとともに、収縮力が改善することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不整脈源性心筋症には既存の心不全治療薬が奏功せず、進行した場合、心臓移植しか治療方法が残されていません。本研究ではプラコフィリン2タンパク質が欠損したiPS細胞由来分化心筋細胞を用いて、その病態解明を行い、遺伝子補充の治療概念を実証しました。精密に遺伝子を改変した不整脈源性心筋症モデル細胞、及びデスモゾームを可視化するイメージング細胞は、難治性心筋症に対する今後の治療法開発において、有用なプラットフォームを提供すると考えられます。

研究成果の概要（英文）：Loss-of-function mutations in PKP2, encoding plakophilin-2, cause arrhythmogenic cardiomyopathy (AC). Here, we generated isogenic induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (iPSC-CMs) with precisely adjusted expression of plakophilin-2 from a patient with AC carrying a heterozygous frameshift PKP2 mutation. After monolayer differentiation, plakophilin-2 deficiency led to reduced contractility, disrupted intercalated disc structures, and impaired desmosome assembly in iPSC-CMs. Allele-specific fluorescent labeling of endogenous DSG2 in the generated isogenic lines enabled real-time desmosome-imaging under an adjusted dose of plakophilin-2. AAV-mediated gene replacement of PKP2 recovered contractility and restored desmosome assembly, which was sequentially captured by desmosome-imaging in plakophilin-2-deficient iPSC-CMs. Our isogenic set of iPSC-CMs recapitulates AC pathology and provides a rapid and convenient cellular platform for therapeutic development.

研究分野：循環器内科学

キーワード：不整脈源性心筋症 疾患iPS細胞 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

不整脈原性心筋症(1)は、主にゲノム遺伝子異常による心筋の障害から、致死性不整脈による突然死や心不全に至る重篤な疾患群として定義される。細胞と細胞をつなぐデスモゾームを構成する遺伝子の変異は、不整脈原性心筋症の発症原因となることが知られ、なかでも PKP2(プラコフィリン 2)(2)遺伝子変異は、最も高頻度に同定されている。不整脈原性心筋症では、不整脈とともに心筋収縮力の低下を来すが、その詳細な分子メカニズムは明らかでなく、その病態を再現し得る精密なヒト疾患モデルの確立が必要と考えられた。

2. 研究の目的

精密に遺伝子を改変した疾患 iPS 細胞由来分化心筋細胞を用いて、不整脈原性心筋症の病態を解明し、遺伝子補充治療概念を実証することを目的とした。

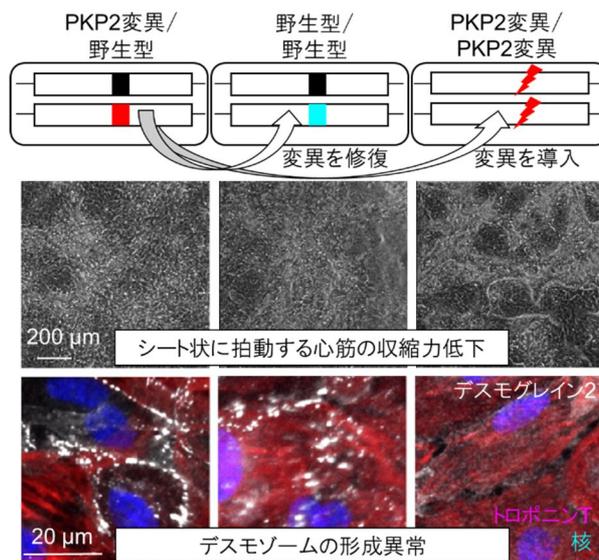
3. 研究の方法

下記3つのステップを経て研究を推進した。

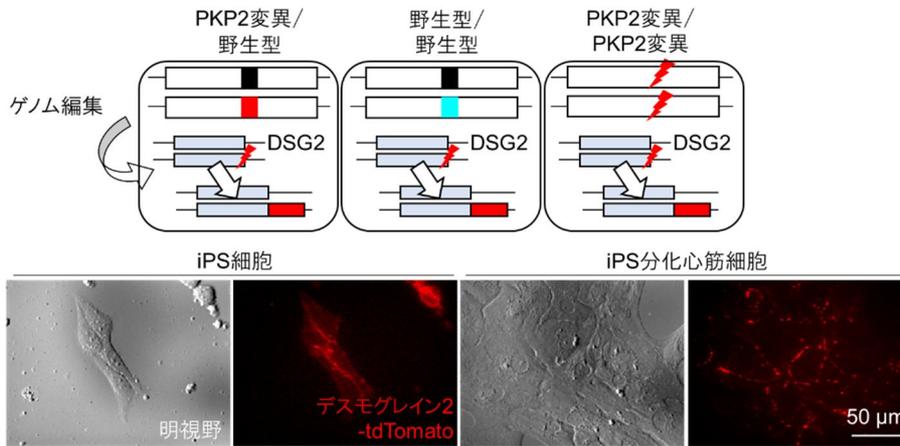
1. 遺伝性 ARVC 症例からの疾患 iPS 細胞樹立及びアイソジェニック細胞セットの作成
2. iPS 細胞分化心筋を用いた機能解析と病態解明
3. アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いた遺伝子導入による治療概念の実証

4. 研究成果

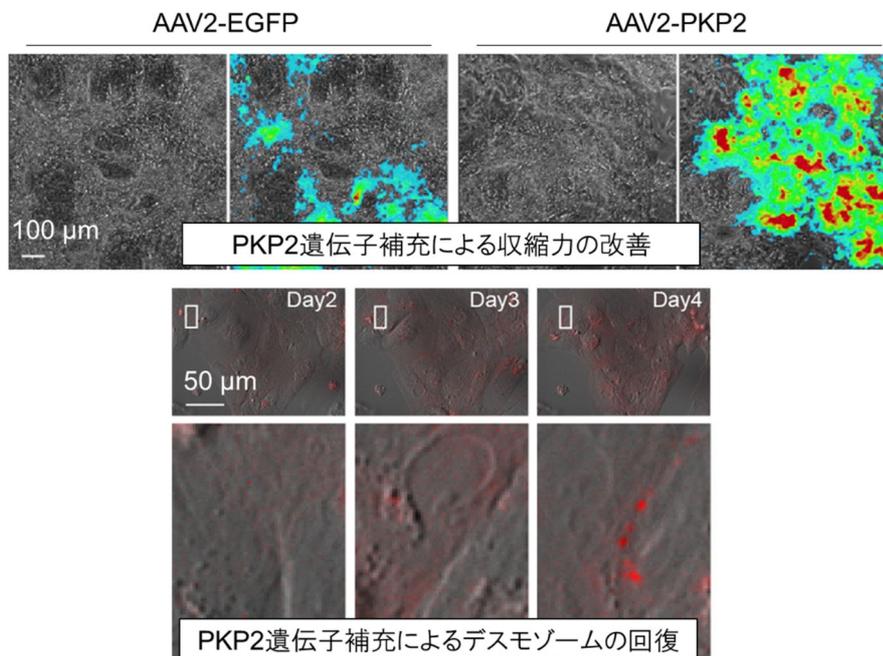
我々は、PKP2 遺伝子の2つの対立遺伝子のうち片方だけに変異があるヘテロ接合型フレームシフト変異(3)により不整脈原性心筋症を発症した症例より、iPS 細胞(PKP2 変異/野生型)を樹立した。ゲノム編集を用いて、ヘテロ接合型変異を正常に修復した iPS 細胞(野生型/野生型)及び両方の対立遺伝子にフレームシフト変異を導入した iPS 細胞(PKP2 変異/PKP2 変異)を作成した(下図上段)。これら遺伝背景が同一の細胞セットを心筋に分化させ、シート状に拍動する心筋の経時的なモーションベクトル解析(4)により、プラコフィリン2タンパク質の減少に伴い、心筋収縮力が低下、興奮伝播が障害されることが明らかとなった(下図中段)。さらに、デスモゾーム(5)タンパク質である DSG2(デスモグレイン2)が、PKP2 の完全欠損により細胞の辺縁から脱落すること、PKP2 の半分量への減少により形成障害を来することが明らかとなった(下図下段)。



デスモゾーム動態をより詳細に解析するため、構築した3つの細胞セットにさらにゲノム編集を行い、DSG2 遺伝子の片方のアレルに特異的に赤色蛍光タンパク質(tdTomato)を挿入したイメージング細胞セットを樹立した。タイムラプスイメージングを行うことで、iPS 細胞から心筋細胞への分化の過程におけるデスモゾームの変化、拍動する心筋細胞におけるデスモゾームの動態を生きた細胞で観察することが可能となった(下図)。



蛍光標識された DSG2-tdTomato 融合タンパク質は内在性遺伝子と同様の挙動を示し、PKP2 欠損によるデスモゾーム形成低下が拍動心筋において観察された。PKP2 変異 iPS 分化心筋細胞、デスモゾームイメージング iPS 分化心筋細胞にアデノ随伴ウイルス(AAV)を用いて PKP2 遺伝子を導入したところ、低下した収縮力が改善し、脱落したデスモゾームが回復する過程が経時的に観察された(下図)。



1 不整脈原性心筋症： 主にゲノム遺伝子異常による心筋の障害から、致死性不整脈による突然死や心不全に至る重篤な疾患群として定義される。若年者やアスリートの死亡原因となるため、社会的にも大きな問題とされる。デスモゾームを構成する遺伝子群の変異により発症すること、拡張型心筋症の一部に本疾患群が潜在化していることが知られている。

2 PKP2(プラコフィリン2)： デスモゾームを構成するタンパク質の一つで、デスモグレイン2、デスモコリン2、デスモプラキンといった他のデスモゾーム構成タンパク質と結合し、細胞間接着を担う。

3 フレームシフト変異： 遺伝子変異のために、遺伝子からタンパク質へ翻訳される際の読み枠がずれることにより、正常なタンパク質が産生されなくなる変異。

4 モーションベクトル解析： 拍動する心筋細胞の動画像をもとに、設定された検出点の動きベクトルを解析することで、非侵襲的に心筋の収縮速度、収縮力、伝播速度を測定する解析法。

5 デスモゾーム(介在板)： 細胞と細胞の間に存在する構造で、細胞どうしをつなぎとめ、収縮する力を伝達する役割がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kohama Yasuaki, Higo Shuichiro, Masumura Yuki, Shiba Mikio, Kondo Takumi, Ishizu Takamaru, Higo Tomoaki, Nakamura Satoki, Kameda Satoshi, Tabata Tomoka, Inoue Hiroyuki, Motooka Daisuke, Okuzaki Daisuke, Takashima Seiji, Miyagawa Shigeru, Sawa Yoshiki, Hikoso Shungo, Sakata Yasushi	4. 巻 10
2. 論文標題 Adeno-associated virus-mediated gene delivery promotes S-phase entry-independent precise targeted integration in cardiomyocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-72216-y	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 -

1. 著者名 Higo Shuichiro, Hikoso Shungo, Miyagawa Shigeru, Sakata Yasushi	4. 巻 -
2. 論文標題 Genome Editing in Human Induced Pluripotent Stem Cells (hiPSCs)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 235 ~ 245
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_21	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 Shiba Mikio, Higo Shuichiro, Kondo Takumi, Li Junjun, Liu Li, Ikeda Yoshihiko, Kohama Yasuaki, Kameda Satoshi, Tabata Tomoka, Inoue Hiroyuki, Nakamura Satoki, Takeda Maki, Ito Emiko, Takashima Seiji, Miyagawa Shigeru, Sawa Yoshiki, Hikoso Shungo, Sakata Yasushi	4. 巻 30
2. 論文標題 Phenotypic recapitulation and correction of desmoglein-2-deficient cardiomyopathy using human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 1384 ~ 1397
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddab127	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 Tabata Tomoka, Kuramoto Yuki, Ohtani Tomohito, Miyawaki Hiroshi, Miyashita Yohei, Sera Fusako, Kioka Hidetaka, Higo Shuichiro, Asano Yoshihiro, Hikoso Shungo, Sakata Yasushi	4. 巻 -
2. 論文標題 Phospholamban p.Arg14del Cardiomyopathy: A Japanese Case Series	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Internal Medicine	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) 10.2169/internalmedicine.8594-21	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 Inoue Hiroyuki, Nakamura Satoki, Higo Shuichiro, Shiba Mikio, Kohama Yasuaki, Kondo Takumi, Kameda Satoshi, Tabata Tomoka, Okuno Shota, Ikeda Yoshihiko, Li Junjun, Liu Li, Yamazaki Satoru, Takeda Maki, Ito Emiko, Takashima Seiji, Miyagawa Shigeru, Sawa Yoshiki, Hikoso Shungo, Sakata Yasushi	4. 巻 17
2. 論文標題 Modeling reduced contractility and impaired desmosome assembly due to plakophilin-2 deficiency using isogenic iPS cell-derived cardiomyocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 337 ~ 351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2021.12.016	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 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Shuichiro Higo, Shungo Hikoso, Shigeru Miyagawa, Yoshiki Sawa, Yasushi Sakata
2. 発表標題 Drug discovery for cardiomyopathies using disease-specific iPSCs
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会 Modelling Cardiovascular Disease with Human iPS Cells: Current Status and Future Prospects (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shuichiro Higo, Shungo Hikoso, Shigeru Miyagawa, Yoshiki Sawa, Yasushi Sakata
2. 発表標題 Generation of Human Disease Model for Personalized Medicine Targeting Intractable Cardiomyopathy
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会 ESC-JCS Young Researchers Session (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 聡希, 肥後 修一郎, 志波 幹夫, 小濱 康明, 近藤 匠巳, 亀田 聡士, 田端 智香, 井上 裕之, 山崎 悟, 武田 真季, 高島 成二, 宮川 繁, 澤 芳樹, 彦惣 俊吾, 坂田 泰史
2. 発表標題 不整脈源性右室心筋症 (ARVC) を迅速に再現するヒトモデル細胞の樹立
3. 学会等名 第6回日本心筋症研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 志波幹夫, 肥後修一郎, 近藤匠巳, 李俊君, 劉莉, 小濱康明, 亀田聡士, 田端智香, 井上裕之, 中村聡希, 武田真季, 池田善彦, 高島成二, 宮川繁, 澤芳樹, 彦惣俊吾, 坂田泰史
2. 発表標題 Phenotypic Recapitulation and Correction of Desmoglein-2-deficient Cardiomyopathy using Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes
3. 学会等名 第68回日本心臓病学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田端智香, 肥後修一郎, 増村雄喜, 志波幹夫, 小濱康明, 近藤匠巳, 亀田聡士, 井上裕之, 中村聡希, 高島成二, 宮川繁, 澤芳樹, 彦惣俊吾, 坂田泰史
2. 発表標題 ハイコンテントイメージング・数値計算ソフトウェアを用いた心筋症iPS 分化心筋におけるカルシウム動態解析
3. 学会等名 第6回日本心筋症研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasuaki Kohama, Shuichiro Higo, Mikio Shiba, Takumi Kondo, Satoki Nakamura, Satoshi Kameda, Tomoka Tabata, Hiroyuki Inoue, Seiji Takashima, Shigeru Miyagawa, Yoshiki Sawa, Shungo Hikoso, Yasushi Sakata
2. 発表標題 Adeno-associated Virus-mediated Gene Delivery Promotes S-Phase Entry-independent Homology-directed Repair in Cardiomyocytes
3. 学会等名 第24回日本心不全学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shuichiro Higo, Shungo Hikoso, Yasushi Sakata
2. 発表標題 Development of Precision Medicine for Arrhythmogenic Cardiomyopathy using Isogenic Human Disease Model
3. 学会等名 第85日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名	田端 智香, 藏本 勇希, 大谷 朋仁, 宮脇 大, 宮下 洋平, 世良 英子, 木岡 秀隆, 肥後 修一郎, 朝野 仁裕, 彦惣 俊吾, 坂田 泰史
2. 発表標題	悪性心室性頻拍と重症心不全を特徴とする 日本におけるホスホランパン p.Arg14del心筋症の臨床像
3. 学会等名	第25回日本心不全学会学術集会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	Takumi Kondo, Shuichiro Higo, Mikio Shiba, Yasuaki Kohama, Satoshi Kameda, Tomoka Tabata, Hiroyuki Inoue, Shota Okuno, Maki Takeda, Yuki Kuramoto, Jong-Kook Lee, Seiji Takashima, Shigeru Miyagawa, Shungo Hikoso, Yasushi Sakata
2. 発表標題	Modeling Augmented Sarcomeric Calcium Retention and Altered Calcium Handling Pathway by TNNT2 160E Mutation using Isogenic Human iPS Cell-derived Cardiomyocytes
3. 学会等名	第25回日本心不全学会学術集会YIA基礎部門優秀賞
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	Shuichiro Higo, Yasushi Sakata
2. 発表標題	Strategies to Promote Homology-directed Repair in Post-mitotic Cardiomyocytes
3. 学会等名	ESC CONGRESS 2021 symposium CRISPR/Cas9 gene editing for heart disease: ready for prime time? (招待講演) (国際学会)
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	肥後修一郎
2. 発表標題	難治性心筋症に対する個別化医療
3. 学会等名	第7回日本心筋症研究会 シンポジウム4「心筋症のゲノム研究最前線」(招待講演)
4. 発表年	2021年

1. 発表者名 近藤匠巳, 肥後修一朗, 志波幹夫, 小濱康明, 亀田聡士, 田端智香, 井上裕之, 奥野翔太, 武田真季, 藏本勇希, 李鍾國, 高島成二, 宮川繁, 彦惣俊吾, 坂田泰史
2. 発表標題 トロポニンT 160E変異を有するアイソジェニックiPS心筋を用いた拡張相肥大型心筋症の病態解明
3. 学会等名 第7回日本心筋症研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroyuki Inoue, Satoki Nakamura, Shuichiro Higo, Mikio Shiba, Yasuaki Kohama, Takumi Kondo, Satoshi Kameda, Tomoka Tabata, Shota Okuno, Yoshihiko Ikeda, Junjun Li, Li Liu, Satoru Yamazaki, Maki Takeda, Emiko Ito, Seiji Takashima, Shigeru Miyagawa, Sawa Yoshiki, Shungo Hikoso, Yasushi Sakata
2. 発表標題 Modeling Reduced Contractility and Impaired Desmosome Assembly due to Plakophilin-2 Deficiency using Isogenic iPS Cell-Derived Cardiomyocytes
3. 学会等名 第86回 日本循環器学会学術集会 YIA (Basic Research部門) 優秀賞
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shuichiro Higo
2. 発表標題 Development of Personalized Medicine Targeting Arrhythmogenic Cardiomyopathy Concealed in Advanced Heart Failure
3. 学会等名 第 86 回日本循環器学会学術集会 幹細胞・遺伝子治療・心臓再生の最前線 Cutting-edge Science in Stem Cell, Gene Therapy, and Regeneration for Cardiovascular Disease
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 肥後修一朗	4. 発行年 2022年
2. 出版社 MEDICAL VIEW	5. 総ページ数 -
3. 書名 Heart View 疾患iPS細胞を用いた心筋症個別化医療へのアプローチ	

1. 著者名 肥後修一朗	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 -
3. 書名 医学のあゆみ	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 不整脈源性心筋症患者由来の多能性幹細胞およびその利用ならびに不整脈源性心筋症治療用医薬	発明者 肥後修一朗、彦惣俊吾、宮川繁、澤芳樹、坂田泰史	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/ 10137	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

重症心不全内科治療学グループ http://www.cardiology.med.osaka-u.ac.jp/?page_id=33635

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	肥後 修一朗 (Higo Shuichiro) (00604034)	大阪大学・医学系研究科・特任准教授(常勤) (14401)	
研究分担者	彦惣 俊吾 (Hikoso Shungo) (30423164)	大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401)	

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