

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15120

研究課題名(和文) isogenicなHCM変異iPS細胞由来心筋細胞を用いたHCM発症機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenic mechanism of HCM using isogenic hiPSC-CMs with HCM mutation

研究代表者

三木 健嗣 (Miki, Kenji)

京都大学・iPS細胞研究所・研究員

研究者番号：10772759

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)：本研究では、ゲノム編集技術によりisogenicなHCM変異を持つヒトiPS細胞を複数株樹立し、心筋細胞への分化誘導を実施したところ、MYH7-R719Q変異を持つ心筋細胞において細胞レベルで有意な肥大を認めた。この細胞を用いて、肥大抑制作用を示す化合物のスクリーニングを探索し、更にその化合物を用いたケミカルプロテオミクスによりターゲット遺伝子(現時点では未発表)を同定した。その遺伝子をKnock outしたヒトiPS細胞ではMYH7-R719Q変異を持つヒトiPS細胞と同様の肥大を認めた。以上より、これまでに報告されていない新たな心筋肥大のメカニズムを見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HCMの原因遺伝子としてこれまで10種以上の遺伝子及び900以上の突然変異が報告されており、様々なHCM患者由来のiPS細胞を用いて研究されているが、そのメカニズムの解明及び有効な治療薬の開発には至っていない。私はisogenic変異株を用いる戦略で同一の遺伝的背景を持つ複数のHCM変異iPS細胞株を作製し、これらを詳細に解析することで、これまで報告されていない新規のHCMメカニズムの可能性を見出した。このメカニズムをさらに解析することで、多くのHCM患者に適用できる治療薬の開発に繋がる可能性があるとともに、今回採用した戦略は様々な疾患領域へ応用可能な方法であり、その意義は大きいと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, I established several hiPSC lines with isogenic HCM mutations using CRISPR/Cas9 technology, and differentiated them into cardiomyocytes (CMs). I found that CMs with MYH7-R719Q mutation showed significant cardiac hypertrophy at the cellular level. Next, I performed the screening of compounds that inhibit hypertrophy in this hiPSC-CMs and identified the target gene by chemical proteomics using the compound (Gene name is unpublished as of this moment). In addition, the hiPSCs in which the gene was knocked out showed cardiac hypertrophy at the cellular level similar to that of human iPS cells with the MYH7-R719Q mutation. Although further analysis is needed, I have found a possible new mechanism of cardiac hypertrophy that has not been reported before.

Furthermore, I was able to publish two papers related to this research within a period of time.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：HCM isogenic hiPSC ゲノム編集

### 1. 研究開始当初の背景

肥大型心筋症(HCM)は遺伝子変異との関連が高く、複数の遺伝子、数百の変異が HCM の病因として報告されており、これまでに HCM 患者由来 iPS 細胞から分化した心筋細胞を用いた研究においても有効な治療薬の開発までには至っていない<sup>1,2)</sup>。

本研究では、ゲノム編集技術を用いて、正常 iPS 細胞に HCM を引き起こす変異を導入した isogenic な HCM 変異 iPS 細胞株を樹立する。これにより、同一の遺伝的背景を持つ HCM 変異株心筋と正常株心筋を比較でき、特定の遺伝子変異による影響を同定できると考えられる。更に、複数の変異の isogenic 株を作製することで、HCM の発症機序として共通するパスウェイが存在するのではと仮説を立て、これまでにないアプローチで HCM 発症機序の解明を試みる。

### 2. 研究の目的

#### isogenic な HCM 変異 iPS 細胞由来心筋細胞を用いた HCM 発症機序の解明

HCM は心筋細胞の異常な肥大により心機能が低下し、その進行に伴い突然死や心不全を発症する国の指定難病である。HCM は家族性があることにより、現在までに原因遺伝子として 16 を超える遺伝子及び 1000 以上の突然変異が報告されている<sup>3)</sup>。また、遺伝子変異が同定された複数の HCM 患者から iPS 細胞を作製し、その iPS 細胞由来心筋細胞を用いて様々な化合物スクリーニング等が世界中で実施されているが、有効な治療薬の開発には至っていない。その理由としては、対象となる健常人と患者の細胞で遺伝的背景が全く異なることにより、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(図 1a)。

そこで申請者は、正常 iPS 細胞株にゲノム編集技術(CRISPR/Cas9)を用いて isogenic な HCM 変異 iPS 細胞株を作製し、それらの心筋細胞を比較することで特定の遺伝子変異

による影響を特定できるのではないかと考えた(図 1b)。更に HCM の主な原因遺伝子として MYH7(患者全体の 25~40%)、MYBPC3(同 25~40%)、TNNT2(同 3~5%)が報告されており、これらの遺伝子は全てサルコメア関連遺伝子である。このことから、点変異は各遺伝子上の様々なところに存在するが、心筋肥大を惹起する共通のメインパスウェイがあるのではと仮説を立てた。これらの遺伝子に焦点をあて、各遺伝子上の複数の点変異に対して isogenic 変異株を作製し、それらを詳細に解析することで、これまでにないアプローチで HCM 発症の機序を解明することを目指した。

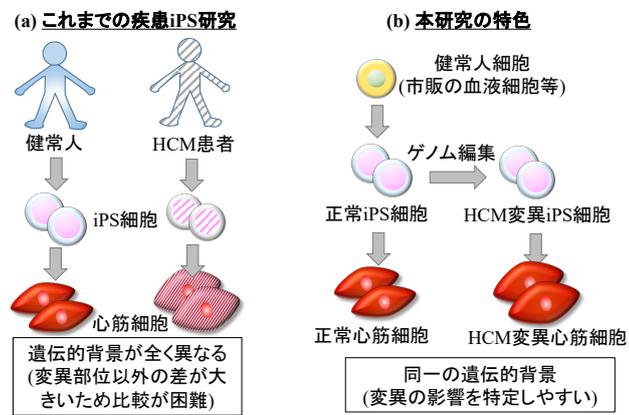


図1 isogenicなiPS細胞を用いる利点

### 3. 研究の方法

(1)CRISPR/Cas9 技術を用いて複数の HCM 変異に対する isogenic な iPS 細胞株を樹立し、順次分化精製して心筋肥大の表現型評価を行った。

(2)変異心筋細胞を用いて、遺伝子発現解析(RNA-seq)及び肥大抑制化合物を用いたケミカルプロテオミクスにより候補ターゲットを絞り込んだ。

(3)候補ターゲットをノックアウトした iPS 細胞を樹立し、その表現型解析を行った。

### 4. 研究成果

(1)複数の HCM 変異に対する isogenic な iPS 細胞株の樹立

本研究において、CRISPR/Cas9 技術により、親株 2 株に対してより重篤と報告されている MYH7-R403Q 変異、MYH7-R719Q 変異、MYBPC3-R502W 変異、MYBPC3-E542Q 変異及び MYBPC3-truncation 変異の樹立を試みた。その結果、MYH7-R719Q 変異、MYBPC3-R502W 変異、MYBPC3-E542Q 変異及び MYBPC3-truncation 変異は樹立に成功し、それらの株について、変異はシーケンスにおいてヘテロ変異及び欠損が確認でき、全て核型解析及び未分化マーカーの発現、心筋分化能は正常であることが確認できた。MYH7-R719Q に関しては図 2 に示すように親株(コントロール株)に対して有意な肥大を確認することができた(図 2)。この傾向は、2

つの親株由来の isogenic 変異(MYH7-R719Q)において同様に確認できた。一方、MYBPC3 変異に関しては、2つの親株由来の R502W、E542Q 及び truncation 変異全てで、分化誘導後の心筋細胞において肥大傾向は認められなかった。この原因としては、MYBPC3 の変異は MYH7-R719Q の変異に比べて、臨床的にも mild な症状であることから、iPS 細胞由来心筋細胞の成熟度では表現型が認められないのではないかと考えた。実際、iPS 細胞由来の心筋細胞は胎児レベルの心筋細胞であるため、より成熟した心筋細胞を作製するために、申請者が発見した ERR $\gamma$  アゴニスト<sup>4)</sup>を分化誘導期間中に添加すると、MYBPC3-truncation 変異心筋細胞においてはコントロール株心筋細胞より肥大傾向を認めた。

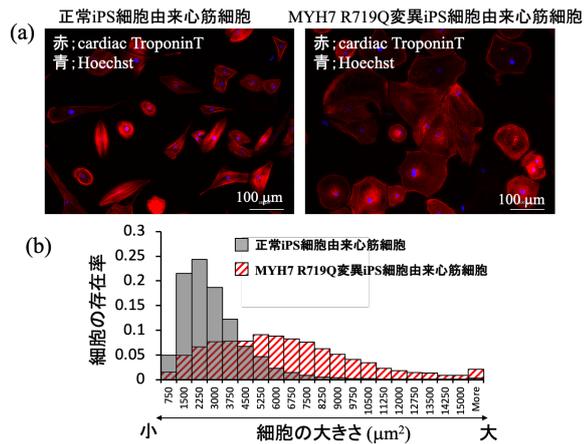


図2. isogenicなHCM変異iPS細胞由来心筋細胞の細胞肥大 (a)免疫染色 (b)細胞面積の分布

MYH7-R403Q 変異に関しては樹立

に至らず、その原因としては MYH7 と MYH6 という二つの遺伝子の配列が酷似しており、特に R403Q 前後の配列は全く同じであったため、MYH7-R403Q の変異が入った株は樹立できたが、それらの株は全て MYH6 にも何かしらの変異(insertion or deletion)が挿入されていた。そのため、今回の研究では親株 2 つからなる MYH7-R719Q 変異を中心にその後の研究を実施した。

(2)本研究において、MYH7-R719Q 変異を導入した 2 つの isotype 株を樹立することができ、且つそれらの心筋細胞では肥大が確認できたため、これらの心筋細胞と各コントロール株の心筋細胞を用いて RNA-seq 解析を行った。タイムポイントとしては、心筋細胞を選別して再播種後 3 日目と 8 日目のサンプルをそれぞれ n=3 で実施した。その結果、両変異株で共通する DEGs(differentially expressed genes)が再播種後 3 日目で 12 個、8 日目においては 22 個見出され、更にそのうち 3 つの DEGs が両日で共通していた(図 3a, b)。これらの因子は 1 つが転写因子、1 つは膜貫通型タンパク質、もう一つは non-coding RNA であった。これらに関しては現在更なる解析を進めているため、現時点での遺伝子名公表は控える。

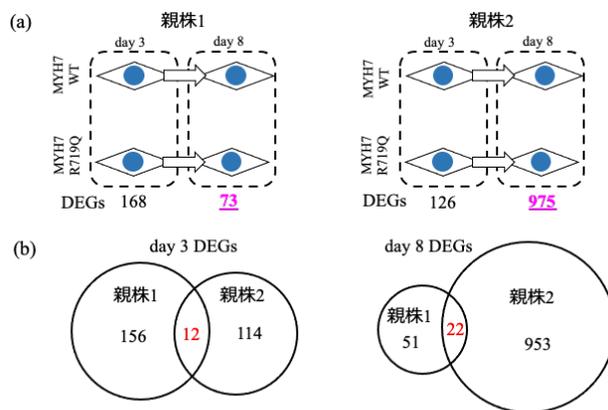


図3. RNA-seq解析におけるDEGs (a)コントロール株に対するDEGs (b)共通DEGs

次に、その他のターゲット探索のアプローチとしてケミカルプロテオミクス解析を行った。今回の研究とは別に

心筋肥大を抑制する化合物を同定する研究を実施しており、その研究で見出された化合物を用いてケミカルプロテオミクス解析を実施した。この解析により抽出された幾つかの候補遺伝子に関して、qPCR や western blot、免疫染色等、isogenic の WT 及び MYH7-R719Q 株由来心筋細胞において詳細に解析したところ、代謝に関係する遺伝子が今回の変異株における心筋肥大と密接に関連していることが推察された。この遺伝子に関しても更なる解析を進め論文化を進めていることから現時点での遺伝子名公表は控える。

(3)上記より見出された代謝関連の遺伝子に関して、CRISPR/Cas9 技術により isogenic コントロール株及び MYH-R719Q 変異株の両株において Knock out 株の作製を行った。コントロール株及び変異株の両株において、シーケンス解析、核型解析及び western blot によりターゲット遺伝子の Knock out 株の樹立を確認できた。各株を心筋細胞へ分化誘導後、免疫染色により細胞面積を確認したところ、コントロール株におけるターゲット遺伝子の Knock out 株において、

MYH-R719Q 変異と同様に肥大することが確認された。一方、MYH-R719Q 変異株におけるターゲット遺伝子の Knock out 株においては、ターゲット遺伝子の Knock out に関わらず肥大を認めた。ケミカルプロテオミクスで使用した化合物は、MYH-R719Q 変異株において心筋細胞の肥大を抑制することがわかっており、この化合物はターゲット遺伝子のアクチベーターであることが確認できている。すなわち、MYH-R719Q 変異により、何らかの形でターゲット遺伝子/タンパク質が抑制されることで、心筋肥大を亢進していることが推察された。

本研究において、これまでに報告されていない新たな肥大メカニズムを見出すことができ、今後はその他の変異株での解析をさらに進めることで、広範な HCM 変異に適応できるかを検討していく。

#### <引用文献>

1. Lan F. et al, *Cell Stem Cell*. 2013 Jan 3;12(1):101-13
2. Han L. et al, *Cardiovasc Res*. 2014 Nov 1;104(2):258-69.
3. 心筋症診療ガイドライン、日本循環器学会、2018
4. Miki K. et al, *Nature Communications*. 2021. in press

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kenji Miki, Kohei Deguchi, Misato Nakanishi-Koakutsu et al.	4. 巻 in press
2. 論文標題 ERR enhances cardiac maturation with T-tubule formation in human iPSC-derived cardiomyocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	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） 10.1038/s41467-021-23816-3	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 Jun Jie Tan, Jacques Guyette, Kenji Miki, Ling Xiao, Gurbani Kaur, Tong Wu, Liye Zhu, Katrina Hansen, King Hwa Ling, David Milan & Harald C. Ott	4. 巻 in press
2. 論文標題 Human iPSC-derived Pre-epicardial Cells Direct Cardiomyocyte Aggregation, Expansion and Organization In Vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	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 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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kohei Deguchi, Kenji Miki, Shigeru Kondo, Ayaka Sakoda, Tsukasa Sugo, Kenichi Imahashi, Tomoyuki Nishimoto, and Yoshinori Yoshida
2. 発表標題 Promising small molecules ameliorated morphological abnormalities of hypertrophic cardiomyopathy in iPSC cell-derived cardiomyocytes.
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Misato Koakutsu, Kenji Miki, Masako Sasaki, Stephanie Napier, Tomoyuki Nishimoto, and Yoshinori Yoshida
2. 発表標題 Identification of a Cell Surface Marker which is Differentially Expressed between Ventricular and Atrial Cardiomyocytes Derived from Human Induced-pluripotent Stem Cell
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 出口康平、三木健嗣、近藤滋、周郷司、西本誠之、吉田善紀
2. 発表標題 ゲノム編集によって作製した疾患iPS心筋細胞を用いた肥大型心筋症治療薬の開発
3. 学会等名 第4回心筋症研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Misato Koakutsu, Kenji Miki, Yuki Naka, Masako Sasaki, Stephanie C Napier, Tomoyuki Nishimoto and Yoshinori Yoshida
2. 発表標題 Differential expression levels of CD151 enable enrichment of atrial cardiomyocytes derived from human induced-pluripotent stem cell
3. 学会等名 European Society of Cardiology Congress (国際学会)
4. 発表年 2020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

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