

令和 4 年 5 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08489

研究課題名(和文) 拡張相肥大型心筋症の分子基盤に介入する治療法の開発

研究課題名(英文) Therapeutic development targeting molecular basis of dilated-phase hypertrophic cardiomyopathy

研究代表者

肥後 修一郎 (Higo, Shuichiro)

大阪大学・医学系研究科・特任准教授(常勤)

研究者番号：00604034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヘテロ接合型TNNT2 160E変異が同定された拡張相肥大型心筋症例よりiPS細胞を樹立し、160E変異を正常に修復、あるいはホモ接合型に160E変異を導入したアイソジェニックiPS細胞を作成した。分化心筋を用いて解析したところ、160E変異はサルコメア局所でのカルシウム濃度の減衰時間を延長させ、拡張速度を低下、弛緩時間を延長させた。160E変異は異常電位を惹起し、NFATc1の核内移行、心筋肥大、CaMKII・ホスホランバンリン酸化の亢進を来した。エピガロカテキンガレートは160E心筋に投与したところ、カルシウム濃度減衰時間を短縮させ、拡張機能を改善させることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の心筋症診療では、「心筋症」と診断された症例に対して、合併する心不全や不整脈に対する対症的な薬物療法が施されているのが現状です。ゲノム遺伝子解析によるTNNT2(トロポニンT) 160E遺伝子変異の同定と、精密に遺伝子を改変したモデル心筋細胞を用いた病態の再現、治療概念の実証は、トロポニン心筋症に対する個別化医療の確立につながりえると考えられます。

研究成果の概要(英文)：We identified TNNT2 160E mutation in a patient with familial HCM showing progressive left ventricular systolic dysfunction. We generated a set of isogenic induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (iPSC-CMs) carrying the heterozygous 160E, homozygously corrected or homozygously introduced 160E using genome editing. Hetero-160E-iPSC-CMs exhibited prolonged calcium decay, relaxation impairment, and hypertrophy compared to WT-iPSC-CMs. These phenotypes were further exacerbated in Homo-160E-iPSC-CMs. TNNT2 160E promoted sarcomeric calcium retention, nuclear translocation of NFATc1, and cardiomyocyte hypertrophy in a dose-dependent manner. Increased phosphorylation of CaMKII and phospholamban at Thr17 was observed in Homo- and Hetero-160E-iPSC-CMs. Epigallocatechin-3-gallate, a calcium desensitizing compound, shortened prolonged calcium decay and relaxation duration in 160E-iPSC-CMs.

研究分野：循環器内科学

キーワード：肥大型心筋症 疾患iPS細胞 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

遺伝性心筋症は、心臓移植の適応となる重症心不全の原因の多くを占める。肥大型心筋症は、異常な心筋の肥大及び心臓の拡張能の低下を基本病態とする疾患であり、多くの遺伝子変異が報告されている。肥大型心筋症の経過中、肥大した心室壁厚が減少、菲薄化し、心室内腔の拡大を伴う左室収縮力低下を来し、拡張型心筋症様の病態を呈する場合があります。拡張相肥大型心筋症と診断される。拡張相肥大型心筋症の正確な有病率は不明だが、肥大型心筋症のおよそ 3%が経過中心機能低下を来すこと、拡張型心筋症に比し、致死性不整脈の罹患率が高く、予後が不良であることが疫学研究から明らかとなっている。肥大型心筋症の原因遺伝子変異は、心臓収縮の基本単位であるサルコメア構成遺伝子に集中し、そこに生じた変異は、収縮・及び拡張機能を障害し心筋障害を惹起する。拡張相肥大型心筋症の症例は、当初心筋肥大を呈しその後拡張相に移行するが、その分子メカニズムは依然明らかでない。また、拡張相肥大型心筋症に関連する遺伝子変異の病原性はより高いことが予想される。従って、拡張相移行例に焦点を絞った分子メカニズム解析は、進行性的心筋症における心筋障害の包括的な理解につながる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究はゲノム編集技術を活用し、大阪大学医学部附属病院において診療を行っている重症心不全例を対象とし、

1. 拡張相肥大型心筋症症例からの疾患 iPS 細胞樹立
2. ゲノム編集を用いたアレル改変による変異修復及びホモ接合型病原変異の導入
3. ゲノム編集を用いた蛍光タンパク質導入によるサルコメアイメージング
4. iPS 分化心筋を用いた詳細な機能解析

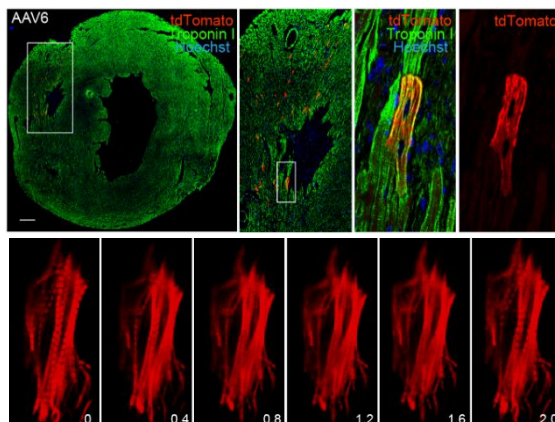
を組み合わせ、拡張相肥大型心筋症の最もアップストリームに存在する分子基盤異常メカニズムを解明し、分子基盤異常そのものに直接介入・是正する治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

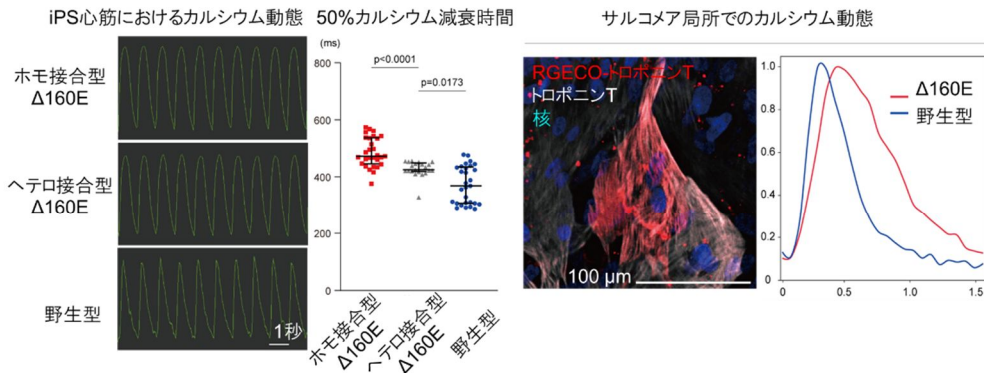
1. 拡張相肥大型心筋症症例からの疾患 iPS 細胞樹立
2. ゲノム編集を用いたアレル改変による変異修復及びホモ接合型病原変異の導入
3. ゲノム編集を用いた蛍光タンパク質導入によるサルコメアイメージング
4. iPS 分化心筋を用いた詳細な機能解析

4. 研究成果

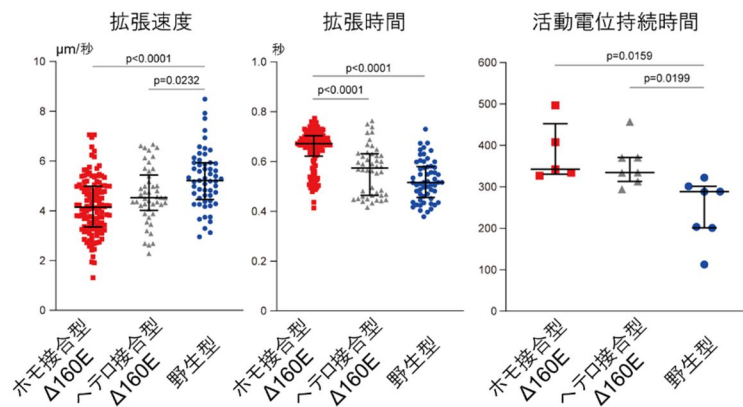
ゲノム編集により DNA 二重鎖が切断された後、正確な遺伝子改変を行う相同組み換え修復 (Homology-directed repair: HDR) は、分裂する細胞の細胞周期 S/G2 期にのみ生じ、心筋細胞を含む分裂しない細胞への応用は困難とされていた。我々は、心筋に特異的に発現するミオシン調節軽鎖タンパク質 (MyI2 遺伝子) の 3' 末端に tdTomato 蛍光タンパク質をノックインする評価系を用いて、新生仔培養心筋細胞において HDR が生じることを報告したが (Ishizu, T, et al. Sci Rep 7, 9363, 2017)、成獣心臓組織の心筋細胞において HDR が生じるかは明らかでなかった。我々は、Cas9 ノックインマウスを用い、左室心筋組織へのアデノ随伴ウイルス (AAV) の直接注入を介して高コピー数の遺伝子導入を行うことにより、マウス成獣心臓組織において HDR が生じることを見出した (右図上)。DNA を 2 本鎖で導入するアデノウイルスを用いた場合、成獣心臓組織での HDR は認められず、1 本鎖 DNA 導入を介した Single-strand template repair メカニズムが関与していることが示唆された。更にこの方法を応用し、ヒト iPS 分化心筋細胞に対して、分化後に AAV による遺伝子導入により直接 HDR を生じさせ、拍動するサルコメア構造を可視化する系を確立し (右図下) 以上の成果を論文報告した (Sci Rep. 2020 Sep 18;10(1):15348)。心筋細胞における AAV を用いた HDR の誘導は、今後の循環器疾患研究に対して様々な応用が期待できると考えられる。



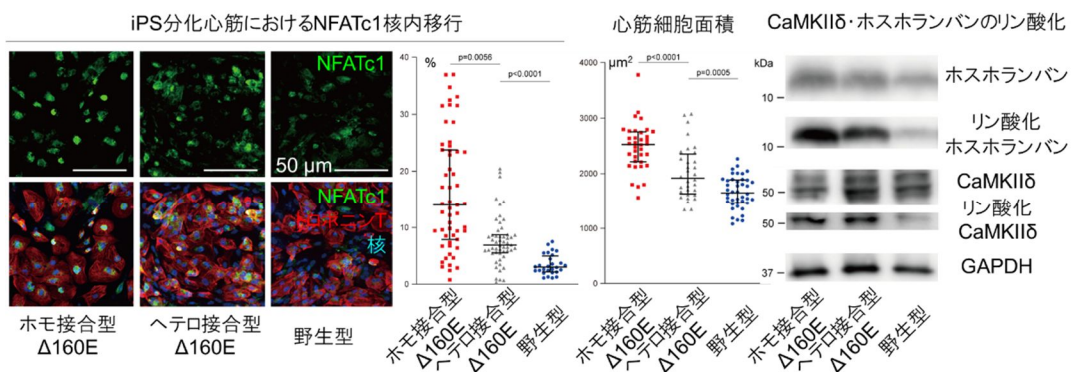
我々は、重症心不全を呈した拡張相肥大型心筋症例において、トロポニンT遺伝子のヘテロ接合型 160E 変異を同定した。本症例より iPS 細胞を樹立し（ヘテロ接合型 160E-iPS 細胞）ゲノム編集を用いて 160E 変異を正常に修復した iPS 細胞（野生型 iPS 細胞）及びホモ接合型に 160E 変異を導入した iPS 細胞（ホモ接合型 160E-iPS 細胞）を作成した。これら遺伝子背景が同一のアイソジェニック iPS 細胞を心筋に分化させ解析したところ、トロポニン T 160E 変異はカルシウム動態の異常を起こし、特にサルコメア局所でのカルシウム濃度の減衰時間を延長させることが明らかとなった（下図）。



モーションベクトル解析を用いて収縮、拡張動態を解析したところ、160E 変異は拡張速度を低下させ、弛緩時間を延長させることが明らかとなり、多電極アレイを用いて電位を速成したところ、160E-iPS 心筋では不規則な電気的興奮が観察され、活動電位持続時間が延長することが明らかとなった（下図）。

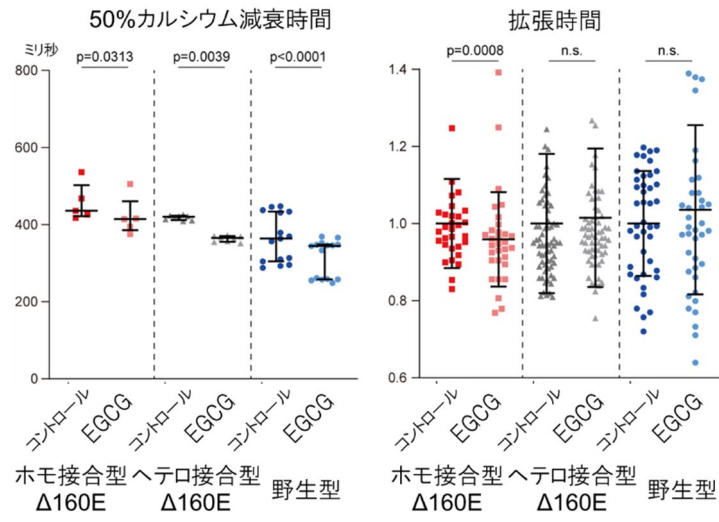


更に、160E 変異は心筋肥大の制御因子である NFATc1 の核内移行を促進し、心筋肥大を促進すること、CaMKII およびホスホランパンのリン酸化の亢進を来すことが明らかとなった（下図）。



エピガロカテキンガレート (EGCG) は、緑茶に含まれるカテキンの一種で、トロポニン C に作用

することで心筋のカルシウム感受性を低下させることが知られている。EGCG を 160E-iPS 心筋に添加したところ、カルシウム濃度減衰時間を短縮させ、拡張機能を改善させることが明らかとなった（下図）。



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 4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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	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18件 (うち招待講演 5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 Shuichiro Higo, Yuki Masumura, Shigeru Miyagawa, Shungo Hikoso and Yasushi Sakata
2. 発表標題 Generation of Human Disease Model for Personalized Medicine Targeting Intractable Cardiomyopathy
3. 学会等名 第36回 ISHR (国際心臓研究学会日本部会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takamaru Ishizu, Shuichiro Higo, Yuki Masumura, Shungo Hikoso, Yasushi Sakata
2. 発表標題 Therapeutic and Diagnostic Application of Genome Editing for Advanced Heart
3. 学会等名 第3回BCVR (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Masumura, Shuichiro Higo, Takamaru Ishizu, Yasuaki Kohama, Mikio Shiba, Takumi Kondo, Satoshi Kameda, Hiroyuki Inoue, Tomoka Tabata, Satoki Nakamura, Seiji Takashima, Shigeru Miyagawa, Shungo Hikoso, Yasushi Sakata
2. 発表標題 High-content Image Analysis Combined with Genome Editing Clarifies the Role for Pkd1 as a Sarcoplasmic Reticulum Protein that Regulates Calcium Influx in Cardiomyocytes
3. 学会等名 第3回BCVR
4. 発表年 2019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 トロボニン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 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	

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	

〔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
研究 分担 者	彦惣 俊吾 (Hikogo 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
---------	---------