

令和 6 年 11 月 1 日現在

機関番号：82406

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17382

研究課題名（和文）iPS細胞を用いたDNM1-L遺伝子変異による心筋症発症機構の解明と治療への応用

研究課題名（英文）Analysis of the pathogenic mechanism of cardiomyopathy using iPS cells established from patients with DNML mutation

研究代表者

大澤 麻登里（Madori, Osawa）

防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・小児科学・助教

研究者番号：40792180

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）：本研究では、心筋症を発症したDNM1L変異を有する患者2例よりiPS細胞を樹立し、心筋細胞への分化誘導を行い、ミトコンドリア形態評価、機能評価、心筋細胞機能評価を行った。その結果、DNM1-L変異心筋細胞では、伸長・老朽化した異常ミトコンドリアが蓄積し、ミトコンドリア膜電位の低下、酸素消費速度の低下、ATP産生低下が起きること、そしてATP産生低下がATP依存性チャネルであるSERCA2aの機能障害をもたらす、心筋細胞の収縮能・拡張能の低下につながることを示唆された。このモデルはミトコンドリア機能改善薬の効果を示し、DNM1-L機能に注目した心筋症や心不全の新しい治療法の開発に有用と考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、臨床的表現型が確立された患者のiPS細胞由来分化心筋細胞を用いて、DNM1L変異による心筋細胞機能障害のメカニズムを示した初めての研究である。近年、ミトコンドリアの品質管理を改善することが、心不全治療の新たな戦略となっている。DNM1LがエンコードするGTPaseの一種であるDrp1は、ミトコンドリアの分裂に寄与し、老化ミトコンドリアを除去するための重要なプロセスの一端を担っている。Drp1の機能に着目したミトコンドリアの品質管理の維持・改善は、新規心不全治療への応用が期待される。本研究は、Drp1を標的とした新規治療法を確立するためのヒト疾患モデルとして貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Dynamin-1-like protein (DNM1L) encodes dynamin-related protein 1 (Drp1), which plays an important role in mitochondrial and peroxisomal division. However, no studies have revealed the mechanism of cardiomyocyte dysfunction caused by DNML mutations in human models. This study aimed to clarify the reason by which DNML mutations cause cardiac insufficiency in humans. We identified DNML mutations in two patients who developed cardiac dysfunction and generated hiPS-CMs from these two patients. In this study, we suggested that DNML mutations caused abnormal mitochondrial morphology, mitochondrial dysfunction, and insufficient ATP production in hiPS-CMs. In addition, hiPS-CMs with DNML mutations showed abnormal Ca²⁺ kinetics and impaired contractile and diastolic dysfunction due to SERCA2a dysfunction caused by ATP deficiency. To our best knowledge, this is the first study that demonstrates the mechanism of cardiomyocyte dysfunction caused by DNML mutations in human models.

研究分野：小児循環器

キーワード：DNM1L ミトコンドリア iPS細胞 心筋症 心不全

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNM1L (Dynamin-1-like protein) は GTPase の一種である Drp1 (Dynamin-1-like protein) をコードする遺伝子であり、Drp1 はミトコンドリア分裂に関与し、ミトコンドリア品質管理に重要な役割を担っている。老朽化したミトコンドリアに Drp1 が重合・収縮することで、異常部位が切り離され、マイトファジーにより加水分解を受ける。近年、*DNM1L* に相同する Drp1 ノックアウト/変異マウスにて心筋収縮能・拡張能の低下ならびにミトコンドリア形態異常を呈することが報告されている。しかし、ヒト心筋細胞にて、*DNM1L* 変異による心筋機能障害の解析を行なった既報告はなかった。

2. 研究の目的

我々は、心筋症・心不全を発症した乳幼児 2 症例 (以下 Patient1, Patient2 と記載) を経験し、*DNM1L* 遺伝子変異により心筋症・心不全を起こすことを見出し、患者由来の iPS 細胞を樹立した。そこで我々は、これらの疾患 iPS 細胞から心筋細胞を分化誘導・作成し、ヒト分化心筋細胞を用いて *DNM1L* 変異による心筋症・心不全発症のメカニズムを解明することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 分化心筋細胞の作成

疾患ならびにコントロール iPS 細胞の分化誘導を行なった。作成方法は、Giwi プロトコル (Lian et al., Nat Protoc. 2013; 8(1)162-175) を用いた。

(2) ミトコンドリア形態異常の解析

疾患由来ならびにコントロール由来の分化心筋細胞の生細胞と電子顕微鏡標本にて、ミトコンドリア形態の比較を行なった。生細胞においては、Mitotracker Red を用いて、ミトコンドリアを染色し、共焦点顕微鏡での観察を行なった。電子顕微鏡標本では、各心筋細胞のミトコンドリアの長径を Image J を用いて測定し、疾患とコントロール間での比較を行なった。

(3) ミトコンドリア機能の解析

ミトコンドリア膜電位の活性評価のために、分化心筋細胞の JC-1 染色を行い、共焦点顕微鏡での解析を行なった。また、高分解能ミトコンドリア酸素活性/細胞代謝エネルギー分析装置 (Orboros Oxygraph-2k) を用いて分化心筋細胞の酸素消費速度 (OCR: Oxygen Consumption Rate) の測定を行なった。

(4) 分化心筋細胞における Ca²⁺ 動態の解析

Ca²⁺ プローブである Ca²⁺ 動態を蛍光顕微鏡にて可視化し、Ca²⁺ 動態指標である F/F₀ ならびに T50 の評価を行なった。

(5) 分化心筋細胞の収縮能ならびに拡張能の解析

高精度ライブセルイメージングシステムを用いて、収縮能・拡張能の定量的解析を行った。安静時ならびに isoproterenol 投与下にてこれらの評価を行なった。

4. 研究成果

(1) 分化心筋細胞の作成

Giwi プロトコルにて、疾患ならびにコントロール iPS 細胞から cardiac troponin T の陽性率が 80% 以上の純度の高い分化心筋細胞の作成に成功した。

(2) ミトコンドリア形態異常の解析

疾患由来分化心筋細胞では、生細胞のミトコンドリア染色において、長く伸長した異常ミトコンドリア形態を呈することを確認した。電子顕微鏡標本での長径測定においても、疾患由来分化心筋細胞では Patient 1, Patient 2 とともにコントロールと比較をして、有意差をもって長径が伸長していることを示した。

(3) ミトコンドリア機能の解析

JC-1 プローブを用いたミトコンドリア膜電位の評価において、patient1, Patient2 いずれの分化心筋細胞でも、コントロールと比較をして、有意にミトコンドリア活性が低下していることを確認した。また、OCR の測定においても、疾患由来分化心筋細胞では Patient 1, Patient 2 ともに、コントロールよりも有意差を持って低下していた。これらの結果により、疾患百分分化心筋細胞では、ATP の産生が低下していることが示唆された。

(4) 分化心筋細胞における Ca^{2+} 動態の解析

Fluo-4 を用いた Ca^{2+} 動態解析では、筋小胞体へからの Ca^{2+} 放出指標である F/F0 は疾患とコントロール間で有意差を認めなかったが、筋小胞体への Ca^{2+} 再取り込みを行う SERCA2 の機能指標である 50% time to decay (T50) は疾患由来分化心筋細胞にて Patient 1, Patient 2 ともに有意な延長を認めた。SERCA2 は ATP 依存性チャンネルであり、ミトコンドリア異常による ATP 産生低下によって障害され Ca 動態異常が起きたと考えられる。

(5) 分化心筋細胞の収縮能ならびに拡張能の解析

高精度ライブセルイメージングシステムを用いた収縮能・拡張能の解析では、疾患由来分化心筋細胞で、Patient 1, Patient 2 ともに収縮能指標である最大収縮速度が定常状態より低値であり、isoproterenol 漸増による収縮速度増加も不良であった。また拡張能指標である最大拡張速度も低値であった。

以上の結果より、*DNM1L* 変異では、ミトコンドリアが適切に分裂・処理されないことによりミトコンドリア品質管理が損なわれ、伸長・老朽化した異常ミトコンドリアの蓄積をもたらすこと、異常ミトコンドリアでは、ミトコンドリア膜電位の低下、酸素消費速度の低下を認め、これらの結果から ATP 産生低下が起きていると考えた。そして ATP 産生の低下が、ATP 依存性チャンネルである SERCA2 の機能障害によるカルシウム動態異常をもたらし、心筋細胞の収縮能・拡張能の低下につながることを示唆された。

本研究は、ヒト心筋細胞にて、*DNM1L* 変異による心筋機能障害の病態解析を行なった世界で初めての研究であった。今後は、本研究の2症例以外の *DNM1L* 変異患者の集積を行い様々な *DNM1L* 変異 iPS 細胞を樹立する、あるいは遺伝子編集技術を用いて様々な *DNM1L* 変異を正常コントロール iPS 細胞に導入することによって、変異の種類と重症度のデータ解析を行うことが課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大澤麻登里
2. 発表標題 iPS細胞を用いたDNM1L遺伝子変異による心筋機能障害機序の解析
3. 学会等名 日本小児循環器学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Madori Osawa
2. 発表標題 Elucidation of the pathogenic mechanism of cardiomyopathy using iPS cells established form patients with DNMI-L mutation
3. 学会等名 日本循環器学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大澤麻登里
2. 発表標題 iPS細胞を用いたDNM1-L遺伝子変異による心筋機能障害機序の解析
3. 学会等名 日本小児循環器学会
4. 発表年 2022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
---------	---------