

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K23950

研究課題名(和文) ヒト心筋細胞の生存促進制御機構の解明と治療応用に関する研究開発

研究課題名(英文) Discovery of novel molecular mechanism to promote human cardiomyocytes survival

研究代表者

木谷 友哉 (KITANI, Tomoya)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：30842257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：当初の計画に従い誘導性Cas9発現ヒト多能性幹細胞の作出に成功したものの、Cas9を安定して誘導することに難渋したことから、予定を変更し、分化誘導後の心筋細胞にCas9発現レンチウイルスCRISPRライブラリーを導入し、ドキソルビシン処理下での生存促進遺伝子のスクリーニングを実施した。全キナーゼを標的としたノックアウトスクリーニングではこれまで心筋細胞の細胞死との関連が全く報告されていない新規の遺伝子が含まれており、この遺伝子のノックアウトすることでドキソルビシンによる心筋細胞の細胞死が再現をもって減少することが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではヒト心筋細胞を用いることで、これまでの動物実験などでは不明であった心筋細胞の生存に重要な役割を持つ可能性のある遺伝子を明らかにすることができた。今後本研究の成果を発展することで、新たな心臓病の治療法の開発につながる可能性があるかと期待している。

研究成果の概要(英文)：We established human induced pluripotent stem cells (iPSCs) with a doxycycline-inducible Cas9 expression cassette at the AAVS1 safe harbor site. However, we found that there was a wide distribution of Cas9 expression in the cells even originated from a single cell clone. Next, we performed kinome-wide CRISPR screen to find genes promoting cell survival under doxorubicin treatment in human cardiomyocytes derived from iPSCs. We found candidate genes to improve cardiomyocyte survival under doxorubicin treatment.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心筋細胞 多能性幹細胞 ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心臓病は本邦を含め、全世界において主要な死因の一つになっており、今後の高齢人口の増加に伴って患者数が増加することが予想されている。心臓を構成し、そのポンプ機能に大きく寄与している心筋細胞の細胞死は、心筋梗塞などの急性心臓障害から慢性期の心不全に至るまで病態の形成に大きな影響を与えている。

近年ではヒト多能性幹細胞より分化して得られるヒト心筋細胞が広く研究で使用されるようになってきているものの、このヒト心筋細胞をプラットフォームとして、心筋細胞の生存および細胞死に関わる分子機構の網羅的な検討はほとんど行われていない。

2. 研究の目的

心臓の病的ストレス時においてヒト心筋細胞の生存を促進させる分子機序を探索し、同定した機序を応用した新規治療法の開発を本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) テトラサイクリン誘導性 Cas9 発現ヒト多能性幹細胞株の樹立と心筋細胞分化

ヒトゲノム上の安全領域である AAVS1 領域に特異的な CRISPR-Cas9 sgRNA を用いて相同組み替えによる遺伝子編集を行い、テトラサイクリン遺伝子発現調節システムを導入することで、誘導性 Cas9 安定発現ヒト多能性幹細胞を樹立する。

株樹立後にレンチウイルスにより全ゲノムを標的とした guide RNA ライブラリーを導入し、二次元培養法にて心筋細胞へと分化を行う。

(2) 心筋細胞生存促進に関わる遺伝子ノックアウトスクリーニング

上記にて得られた心筋細胞にテトラサイクリンで Cas9 の誘導を行い、ドキシソルピシンにて処理後、生存細胞集団の gRNA を標的としたディープシークエンスを行う。ドキシソルピシン非処理群のディープシークエンス結果と比較することで、心筋細胞の生存促進に関わる遺伝子群を同定する。

4. 研究成果

(1) 誘導性 Cas9 発現ヒト多能性幹細胞の作出

誘導性 Cas9 発現ドナーベクターおよび AAVS1 領域ゲノム編集ベクターを 4D-Nucleofector 装置を用いてヒト多能性幹細胞に導入を行い、G418 (100 µg/ml) 耐性の単一細胞由来コロニーを選択し、ゲノム DNA の AAVS1 領域を PCR にて増幅することで、テトラサイクリン遺伝子発現調節システムの配列が標的の部位に導入されているクローンを同定した (図 1B)。引き続き配列の導入が確認できたクローンを継続培養し、ドキシサイクリン添加後、蛍光免疫染色にて Cas9 蛋白質の発現が誘導されることを確認した (図 1C)。

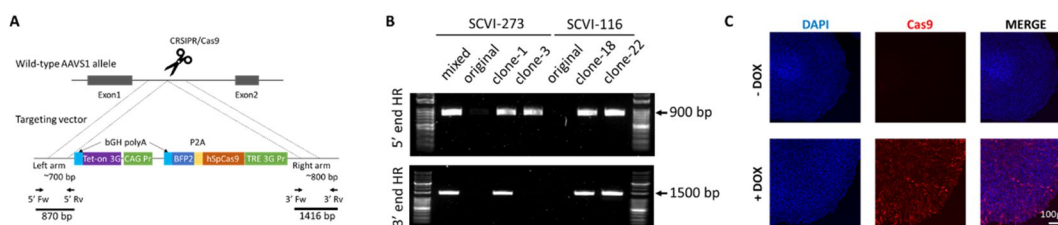


図 1. 誘導性 Cas9 発現ヒト多能性幹細胞の作出

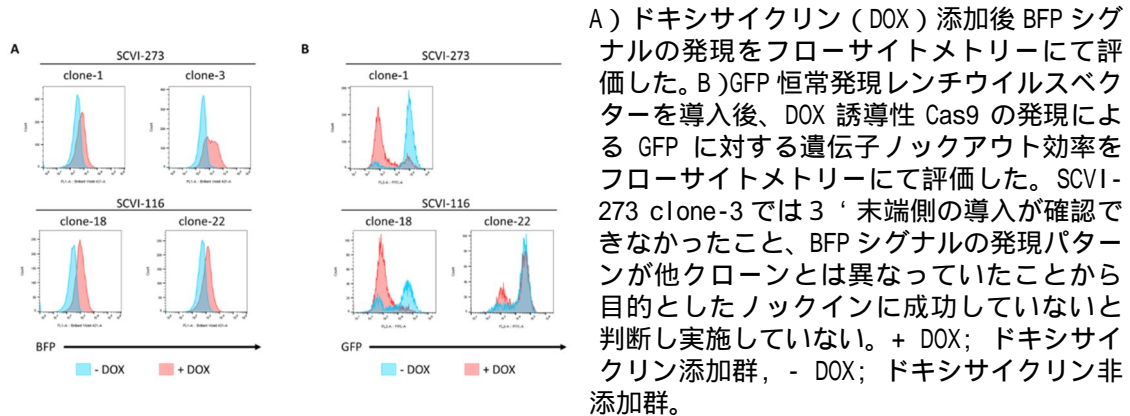
A) CRISPR を用いた AAVS1 locus への誘導性 Cas9 導入の概略図。B) PCR による誘導性 Cas9 配列導入の確認。SCVI-273 clone-3 では 3' 末端側の導入が確認できない。C) SCVI-116 clone-18 におけるドキシサイクリン (DOX) による Cas9 誘導。ドキシサイクリン添加群 (+ DOX)、非添加群 (- DOX) 各々を抗 Cas9 抗体で免疫染色を行った。

次に単一クローンから培養を継続した細胞集団で Cas9 の発現が均一に誘導されていること

を確認するために、ドキシサイクリン添加後、フローサイトメトリーを用いて BFP 発現レベルの評価を行った。すると各クローンにより BFP の発現強度はさまざまであり、ドキシソルビシン添加前とほぼ同等のシグナル強度の細胞分画が存在することが明らかになった(図 2A)。BFP のシグナル強度が比較的弱いため実際の Cas9 の発現を反映できていない可能性を想定し、GFP に対する特異的 gRNA を発現する GFP 恒常発現レンチウイルスベクターを選択したクローンに導入し、ドキシサイクリン添加による GFP シグナルの変化をフローサイトメトリーを用いて評価した。するとクローン間により程度はさまざまであったが、ドキシサイクリン添加後において GFP シグナル陰性細胞集団の明らかな増加は認められたものの、依然として GFP シグナル陽性細胞集団が残存していることが明らかになった(図 2B)。

以上の検討から、AAVS1 領域を標的としたゲノム編集を行った単一クローン由来の細胞株であっても、長期による培養の後に Cas9 の発現を安定的に均一に誘導することができる細胞株を得ることが困難である可能性が考えられた。

図 2. 誘導性 Cas9 発現ヒト多能性幹細胞における Cas9 誘導と遺伝子ノックアウト効率の評価



A) ドキシサイクリン (DOX) 添加後 BFP シグナルの発現をフローサイトメトリーにて評価した。B) GFP 恒常発現レンチウイルスベクターを導入後、DOX 誘導性 Cas9 の発現による GFP に対する遺伝子ノックアウト効率をフローサイトメトリーにて評価した。SCVI-273 clone-3 では 3' 末端側の導入が確認できなかったこと、BFP シグナルの発現パターンが他クローンとは異なっていたことから目的としたノックインに成功していないと判断し実施していない。+ DOX; ドキシサイクリン添加群, - DOX; ドキシサイクリン非添加群。

(2) CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子ノックアウトスクリーニング

当初の計画を変更し、分化誘導後の心筋細胞に直接 Cas9 発現レンチウイルスライブラリーの導入を行うこととした。まず全キナーゼを標的としたライブラリーを用い、ドキシソルビシン処理後の生存細胞と非処理細胞より各々ゲノム DNA を回収し、次世代シーケンサーでエンリッチされている gRNA 情報を解析し、ノックアウトすることでドキシソルビシン処理下での心筋細胞の生存を促進する遺伝子のランキングを作成した(図 4A、具体的な遺伝子名は論文投稿まで非公表とさせていただきます)。さらに、検出された上位 30 位までの遺伝子を BioPlanet⁵⁾を用いてパスウェイ解析を実施した(図 3B)。その結果、Fas シグナル経路、PI3K 経路、Gq など心筋細胞のアポトーシスに深く関与している経路が上位に検出された。

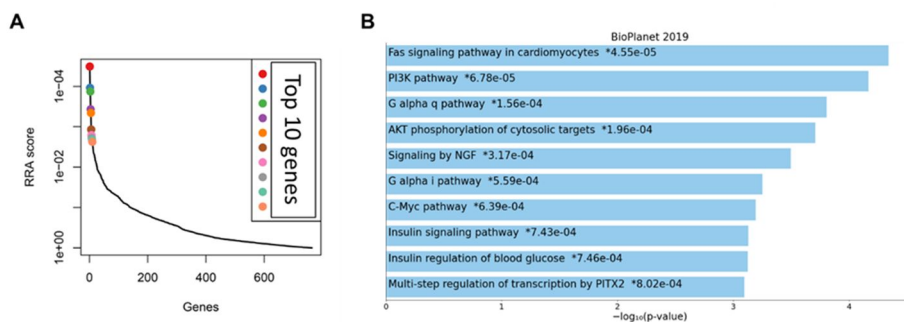


図 3. 全キナーゼを標的とした遺伝子ノックアウトスクリーニングの結果

A) ドキシソルビシン処理下でノックアウトすることにより心筋細胞の生存を促進する遺伝子のランキング(詳細は論文投稿まで非公表)。B) BioPlanet を用いた上位 30 位までの遺伝子のパスウェイ解析。

(3) CRISPR/Cas9 スクリーニングより得られた結果に基づく新規標的遺伝子の探索

次に得られた遺伝子群より、これまでに心筋細胞機能障害への関与が報告されていない遺伝子に着目して、実際にドキシソルビシンによる心筋細胞死へ影響を与えているのか確認を行った。CRISPR-Cas9 ノックアウトシステムを用いてこの遺伝子を標的としたノックアウト心筋細胞を作成し、この細胞に対してドキシソルビシンによる処理を行ったところ、MTT アッセイならびに蛍光色素を用いて生細胞及び死細胞の画像を取得したところ、心筋細胞の細胞死が

著名に抑制されているという結果が得られた。

以上より本研究によって得られた遺伝子群を引き続き評価し、治療応用の発展性を探索することで、心筋細胞の生存を促進するという方法による新しい心疾患の治療法開発が可能になると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tomoya Kitani
2. 発表標題 Cardiovascular Disease Modeling and Translational Research Using Human induced Pluripotent Stem Cells: Opportunity and Challenge
3. 学会等名 2020 International Conference of Korean Society for Molecular and Cellular Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoya Kitani
2. 発表標題 Disease Modeling and Therapeutic Implications for Cancer Therapeutics-Related Cardiac Dysfunction using Human Pluripotent Stem Cells
3. 学会等名 66th Annual Scientific Meeting of The Korean Society of Cardiology (国際学会)
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
---------	---------