

令和 5 年 5 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08193

研究課題名（和文）iPS技術を利用した心筋症の遺伝子型-表現型相関を決定する分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of genotype-phenotype correlation in cardiomyopathy using disease-specific isogenic iPS cells

研究代表者

古道 一樹 (Kodo, Kazuki)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：10338105

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：今回我々は、サルコメア構造タンパクをコードするMYH7遺伝子に、肥大型、拡張型および左室心筋緻密化障害(LVNC)の各心筋症を引き起こす変異を導入したiPS細胞株を作製し、表現型の差異が生じるメカニズムの解明を目指した。LVNC特異的な変異を導入したiPS細胞由来心筋細胞(LVNC iPS-CM)は、サルコメア構造が断裂し、さらに細胞増殖能の亢進が見られた。網羅的遺伝子発現解析で、LVNC iPS-CMでは、コントロール心筋細胞に比してHIF1A関連シグナルの活性化が見られ、低酸素環境における胎児心筋細胞の増殖能亢進を模倣した細胞内遺伝子制御パターンが病態を反映する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先行研究で、低酸素環境における心筋細胞増殖能および心室の肉柱形成亢進について動物実験における報告が少数認められていたが、ヒトにおいて実証されたことは無かった。本研究で、胎児心筋の低酸素環境下ではMYH7の発現が亢進するが、MYH7変異により心筋繊維構築が障害された場合、心筋細胞内でHIF1A活性化を介して低酸素環境を模倣することにより、MYH7発現を強制的に増加させようとする代償機構が働く可能性、さらに低酸素環境を模倣した遺伝子発現パターンが心筋細胞の成熟を障害し、心筋緻密層の形成が破綻する可能性が示された。ヒト心筋成熟の障害機序の一端を解明することで、心筋症の治療開発の一助となる知見を得た。

研究成果の概要（英文）：In this study, we generated iPS cell lines in which the Myosin heavy chain 7 (MYH7) gene was mutated to cause hypertrophic, dilated, or left ventricular noncompaction (LVNC) cardiomyopathies in order to elucidate the mechanism underlying the genotype-phenotype correlation. The LVNC-specific iPS cell-derived cardiomyocytes (LVNC iPS-CM) showed a disruption of the sarcomere structure and increased proliferative potential. Comprehensive gene expression analysis revealed activation of HIF1A-related signals in LVNC iPS-CMs compared to control iPS-CMs, suggesting the intracellular gene regulatory pattern that mimic the increased proliferative potential of embryonic cardiomyocytes in hypoxic environments may reflect the pathophysiology of LVNC.

研究分野：小児循環器

キーワード：心臓発生 胎児心筋細胞 iPS細胞 左室心筋緻密化障害 低酸素 サルコメア

1. 研究開始当初の背景

拡張型心筋症(dilated cardiomyopathy: DCM)は、有病率約 1/2500 で、進行性の心室拡張および収縮機能障害によって特徴付けられる。罹患者の寿命は限られており、若年発症例は予後不良である。肥大型心筋症(hypertrophic cardiomyopathy: HCM)は、若者の心臓突然死の主要な原因であり、最も一般的な遺伝性心臓疾患である。HCM の有病率は、世界中で約 1/500 と考えられている。左室心筋緻密化障害(left ventricular non-compaction: LVNC)は、特に小児領域の心筋症として近年注目されている。LVNC では、左心室の拡張障害や収縮障害、不整脈、および血栓塞栓症が認められる。LVNC の左室心筋は、全層にわたって緻密な状態に成熟せず、深い間隙と肉柱が心筋層に残存しており、胎児期心筋層の形態に類似する。これら 3 種類の心筋症の遺伝的原因の多くは、オーバーラップすることが知られており、これは同一遺伝子上でも変異部位が異なる場合、異なる表現型の心筋症が発症することを意味する。しかし、その表現型を決定する詳細な分子機構は不明であった。

そこで本研究では、健康人由来の正常コントロールヒト人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell: iPSC)に CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて変異を導入し、遺伝学的に同一遺伝子系統(isogenic)の細胞間で、心筋症の表現型特異的な遺伝子変異が与える影響を解析することにより、個体の遺伝学的背景によるバイアスを排除し、正確な遺伝子型-表現型相関の解明を目指した。

2. 研究の目的

LVNC、DCM、および HCM は、小児の遺伝性心臓疾患においてトップ 3 に入る高頻度の病態で、小児および若年層における心臓突然死の主因である。本研究では iPSC より誘導した心筋細胞(iPSC-derived cardiomyocytes: iPSC-CMs)を解析ツールとして用いて、ヒト心筋細胞の機能評価を行うことを基本とし、特に、isogenic iPSC-CMs を用いて、これら 3 大心筋症の分子、細胞レベルにおける遺伝子型-表現型相関の解明を目指す。この視点は将来、予後の推定や、遺伝子型に応じた新規治療法の開発にとって重要な知見を提供するものであると考えられる。研究開始時点での達成目標として、各心筋症の表現型決定に重要なシグナルの解明と、各心筋症の細胞レベルでの表現型を救済することができるシグナル阻害剤等の薬剤を同定するための基礎的知見を得ることが設定された。本研究においてゲノム編集によりコントロール iPSC より作製した isogenic iPSC-CMs の疾患モデルは、患者由来疾患 iPSC モデルで問題となる個体間の遺伝的バックグラウンドの影響を受けず、正確な疾患特異的表現型およびその表現型形成にかかわる分子制御異常の解析が可能である。本ツールを用いた解析による詳細な疾患特異的分子メカニズムの特定は、表現型決定に重要な役割を果たす発生学的洞察を提供し、遺伝子型に対応した重症度・予後の推定、および遺伝子型特異的治療法の開発につながるインパクトを有すると考えられた。

3. 研究の方法

(1) **表現型特異的変異を導入した isogenic iPSC 株作製:** 本研究では、「心筋症の表現型特異的な変異を導入した iPSC-CMs は、細胞レベルでその表現型に対応した異常を示す」という仮説をもとに、ゲノム編集技術を応用して、心筋症表現型特異的な isogenic iPSC-CMs を作製する。具体的には、正常コントロール iPSC 株に CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて、DCM, HCM, LVNC それぞれの表現型特異的に認められる MYH7 遺伝子変異を導入する【表 1】。変異を導入した isogenic iPSC 株および、変異の無いコントロール iPSC 株を、monolayer 心筋分化誘導法(Burridge PW et al. Nat Methods 2014)を用いて心筋細胞に分化させる。疾患特異的表現型が isogenic iPSC-CMs で再現されることを確認するため、各心筋細胞の構造的異常を免疫染色および電子顕微鏡を用いて解析する。さらに収縮能、細胞増殖能について、パッチクランプ、免疫染色、FACS 解析を行う。

Symbol	遺伝子名	表現型特異的変異		
		DCM	HCM	LVNC
MYH7	Myosin heavy chain 7	L1038P	R403Q	IVS8+1 g>a

【表 1】本研究でゲノム編集を行った MYH7 心筋症特異的変異と先天性心筋症の遺伝子型-表現型相関

(2) **各心筋症特異的 isogenic iPSC-CMs 間における細胞内制御シグナルおよび遺伝子発現の差異の検討:** 各心筋症特異的に変化する心筋細胞内シグナルを検出するために、網羅的な mRNA 発現パターンの解析を行う。分化誘導開始後 30 日目の iPSC-CMs を用いて RNA-sequencing 解析を行う。コントロールと各表現型特異的 iPSC-CMs の対比に加え、各表現型特異的 iPSC-CMs 間の mRNA 発現パターンを比較し、表現型特異的に変化するシグナルを同定する。

4. 研究成果

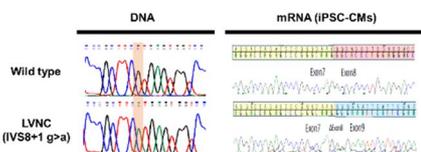
(1)心筋症特異的 isogenic iPSC 株の作成:

正常ヒトコントロール iPSC として、253G4, 201B7 の 2 種類の株を用いて実験を行った。

CRISPR/Cas9 と PiggyBac トランスポゾンを利用したゲノム編集技術を用いて、MYH7 の各心筋症特異的変異がホモで導入された iPSC 株の樹立に成功した【図 1,2】。興味深いことに、splicing site に塩基置換を生じる LVNC 特異的 MYH7 変異を導入した iPSC 株から分化誘導した iPSC-CMs の mRNA を解析したところ、exon8 の skipping が同定されており、本システムの分子生物学的な病態解明への有用性が示された【図 2】。

(2)心筋症特異的 isogenic iPSC-CMs の形態:

HCM 特異的変異を導入した iPSC 株が、いずれも心筋分化効率低下してしまい、十分な心筋細胞量を得ることが困難となったため、以降の研究は野生型コントロール(WT)、DCM、LVNC の 3 グループ間での評価を行うこととした。既報と同様に、DCM iPSC-CMs はサルコメア配列の乱れが認められた。LVNC iPSC-CMs は DCM に比してさらに重篤にサルコメア配列が障害されている様子が観察された【図 3】。



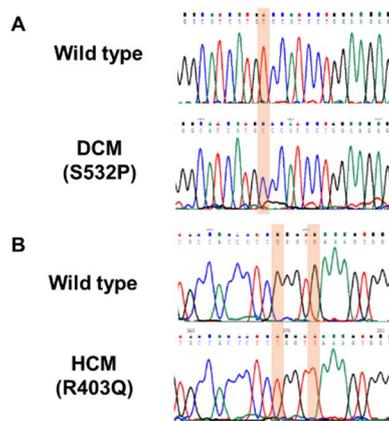
【図 2】LVNC 特異的 MYH7 変異がゲノム編集により導入された isogenic iPSC 株とその iPSC-CMs から抽出した mRNA に認められた exon skipping 異常

(3)電子顕微鏡による心筋症特異的 iPSC-CMs の微細構造形態:

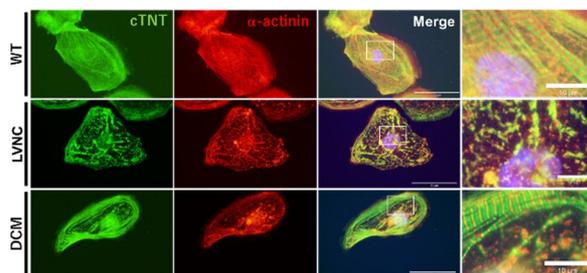
各心筋症特異的 iPSC-CMs の細胞内微細構造を解析するため、電子顕微鏡を用いた観察を行った。その結果、LVNC iPSC-CMs において、野生型(WT)や DCM に比してミオシンフィラメントの断裂や、錯綜配列が有意に高頻度に認められることが明らかとなった【図 4】。

(4)心筋症特異的 iPSC-CMs の増殖能:

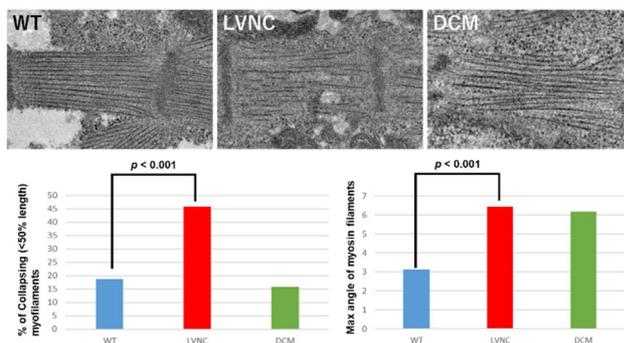
WT, DCM および LVNC iPSC-CMs に対して、細胞培養液に EdU を加え、蛍光免疫染色により文化開始誘導後 2 週間の段階における細胞増殖能評価を行った。その結果 DCM および LVNC iPSC-CMs は WT に比して EdU 陽性細胞(S 期細胞)の割合が有意に増加していることが明らかとなった【図 5】。LVNC iPSC-CMs に関して、この結果は研究代表者がこれまでに解明した TBX20 変異により発症する左室心筋緻密化障害の発症メカニズム(Kodo K et al. Nat Cell Biol. 2016) と反する現象である。過去の動物実験に基づく、左室緻密層の形成異常は、細胞周期の亢進、低下どちらのパターンも報告されており、サルコメア構造タンパクの異常を原因とする左室心筋緻密化障害の発症機序として、細胞周期の異常亢進が関与する可能性



【図 1】DCM 特異的(A: S532P)および HCM 特異的(B: R403Q)MYH7 遺伝子変異がゲノム編集により導入された isogenic iPSC 株



【図 3】蛍光免疫染色を用いた各心筋症特異的 iPSC-CMs のサルコメア構造の観察 右図は白枠領域の拡大像を示す。cardiac troponin-T (cTNT: 緑), a-actinin (赤), Hoechst(青)



【図 4】電子顕微鏡を用いた各心筋症特異的 iPSC-CMs のサルコメア構造の観察 LVNC 特異的 iPSC-CMs で、ミオシンフィラメントの断裂(% of collapsing myofilaments)およびミオシンフィラメント整列角の乱れが有意に上昇した。

が示唆された。一方で WT に比して DCM や LVNC iPSC-CMs では、未熟性が高いことを反映する可能性も考えられた。

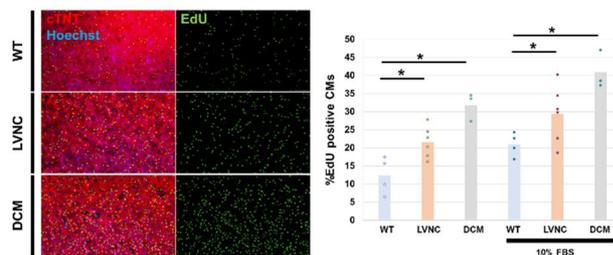
(5)RNA-seqを用いたLVNC特異的な病態形成に関わるシグナル同定:

これまでその病態発症メカニズムに不明な点の多いLVNCに関して、発症に直接関与する心筋発生過程の分子機構の異常を同定するため、RNA-seqによる網羅的遺伝子発現解析を行った。非心筋細胞のコンタミネーションによるバイアスを最小限に抑え、データの正確性を期すために、FACSで心筋純化度を評価、純化精製培地を3日間使用することでWT、LVNC、DCMすべての系統で95%以上の心筋純化を確認した。心筋分化誘導開始後16日のiPSC-CMsからRNAを抽出した。WT、LVNCおよびDCM iPSC-CMsの各群3サンプルを用いてRNA sequenceを実施し、LVNCに特異的に病的亢進が認められる上流調節分子としてHIF1Aパスウェイ(IPA-Upstream Regulator Analysis, Expr Log Ratio 2.6, Activation z-score 2.7, p-value of overlap 1.61E-08)を同定した【図6】。

RNA-seqで示された結果を検証するため、関連因子のmRNA発現量をqRT-PCRで解析した結果、LVNC iPSC-CMsのMYH7 mRNA発現は有意に低下し、HIF1A関連因子のいくつかはHIF1Aシグナル活性の増強を示す結果となった【図7】。

MYH7変異特異的なLVNC iPSC-CMsの細胞レベルでの観察を基とした、これらの結果から導かれる病態として、以下が考えられる。MYH7遺伝子変異により、不完全なMYH7 mRNAがコードされる。変異型MYH7タンパク発現に加え、リボソームによるmRNA品質管理機構により、MYH7の変異mRNAが分解され、MYH7タンパク発現量が低下することにより、正常な心筋サルコメア構造の構築に支障が生じる。MYH7は胎生期の未熟な心筋細胞に優位に高い発現が認められ、その発現は胎児の低酸素環境下で誘導が増強される。MYH7タンパク量を補うため、心筋細胞内でMYH7発現を環境である低酸素刺激下での遺伝子発現パターンがmimicされる代償機構が働く。低酸素環境様の遺伝子発現パターンは、心筋細胞の増殖を亢進させるとともに、心室における肉柱形成を促進させる。心室構造が肉柱に富む形態となるとともに、不完全に構築されたサルコメア構造は心筋機能障害をもたらす、LVNCの病態につながる。

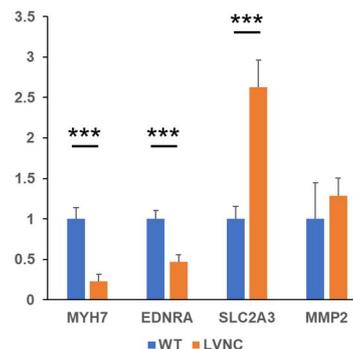
本課題の研究期間内でLVNC iPSC-CMsの表現型救済に関する実験は行うことができなかった。そのため、今後の展望として、LVNC特異的に認められたこのHIF1Aシグナル亢進に対する薬物的介入法を、iPSC-CMsを用いた*in vitro*の実験系で検討することにより、将来的な小児心筋症に対する新たな薬物療法の確立につながる有用な知見を得ることを目指すものとする。



【図5】LVNCおよびDCM iPSC-CMsに認められた細胞増殖能亢進 * $p < 0.05$

Gene	Activation z-score	p-value of overlap	Gene	Activation z-score	p-value of overlap
LVNC-WT			DCM-WT		
TGFB1	4.1	2.89E-16	beta-estradiol	4.462	6.12E-34
ESR1	2.061	5.13E-12	TGFB1	6.761	4.14E-31
beta-estradiol	5.068	3.13E-10	ESR1	2.894	1.62E-21
forskolin	2.279	1.07E-09	PDGF BB	3.801	5.1E-14
PDGF BB	3.684	2.19E-09	PTC-209	-3.569	3.19E-13
PTC-209	-2.182	3.93E-09	8-bromo-cAMP	3.801	6.41E-13
salirasib	-3.978	5.77E-09	MM-589	-3.825	7.76E-13
HIF1A	2.765	1.61E-08	medroxyprogesterone acetate	3.443	3.41E-12
MM-589	-2.515	1.86E-08	doxorubicin	4.255	3.86E-12
ATF4	3.056	7.63E-08	WNT3A	4.093	1.91E-11
IGF1	2.097	7.85E-08	PGR	2.312	3.22E-11
cisplatin	2.261	9.94E-08	Alpha catenin	-5.076	3.38E-11
AGT	2.238	9.94E-08	tretinoin	2.377	3.79E-11
8-bromo-cAMP	3.79	1.3E-07	AGT	4.375	5.11E-11
lactacystin	2.751	2.93E-07	progesterone	2.745	7.04E-11

【図6】Ingenuity Upstream Analysisを用いたRNA-seqの解析結果 LVNC iPSC-CMs vs. WT iPSC-CMs (左表)およびDCM iPSC-CMs vs. WT iPSC-CMs (右表)の解析結果を示す。多くの共通したpathwayが候補に挙がっているが、LVNC iPSC-CMsで特徴的な上流因子として、HIF1Aに関連するシグナルが同定された。



【図7】MYH7およびHIF1A下流因子の遺伝子発現 分化誘導開始後2週間のLVNC iPSC-CMsおよびWT iPSC-CMsの遺伝子発現量をqRT-PCRで解析した結果、LVNC iPSC-CMsにおけるMYH7 mRNA量低下とHIF1A下流因子のシグナル活性化に応じた変化が認められた。*** $p < 0.05$

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	芝田 晋介 (Shibata Shinsuke) (70407089)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・訪問教授 (32612)	
研究分担者	湯浅 慎介 (Yuasa Shinsuke) (90398628)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師 (32612)	

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