

令和 5 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08421

研究課題名(和文) 心筋症を誘発するH0IL-1L遺伝子異常の心筋症発症・進行機序の解明

研究課題名(英文) Revealing novel mechanisms of cardiomyopathy development by using H0IL-1L deficiency iPS cells.

研究代表者

馬場 志郎 (Baba, Shiro)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：60432382

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)：H0IL-1L異常症における心筋症発症機序解明のため、ヒトiPS細胞から心筋細胞を作製し評価を行った。患者iPS細胞、H0IL-1LノックアウトiPS細胞由来心筋細胞では核数や細胞サイズに異常を認めた。また、骨格筋モデルとして使用したC2C12細胞のRNAシーケンスの結果(細胞成熟異常)をもとに、心筋細胞分化過程における細胞周期について評価したところ、H0IL-1L異常iPS細胞由来の心筋細胞ではM期の心筋細胞蓄積を有意に認めた。以上から、H0IL-1L異常症における細胞周期制御を介した心筋成熟異常が心筋症発症の原因の一部であ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

現在、H0IL-1L欠損症における拡張型心筋症発症に関する研究の報告は皆無であるが、ここまでの本研究で得られているデータからは、細胞内アミロペクチン蓄積・アポトーシス・自己炎症と拡張型心筋症発症との関わりだけでなく、心筋細胞の分化成熟異常と拡張型心筋症発症との関わりについて結果が得られており、極めて新しい知見である。多くの拡張型心筋症は単一遺伝子病としてではなく複合的な要素が関連して発症することが知られている。単一の遺伝子異常で、この様に様々な側面から拡張型心筋症発症機序解明について研究が可能である可能性が高く、多くの拡張型心筋症患者の予後改善に結びつく結果が期待される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanisms of cardiomyopathy development in H0IL-1L deficiency patients, we generated cardiomyocytes from human iPS cells. Patient iPS cell- and H0IL-1L knockout iPS cell-derived cardiomyocytes showed abnormalities in the number of nuclei and cell size. In addition, based on the results of RNA sequencing of C2C12 cells used as a skeletal muscle model (cell maturation abnormality), we evaluated the cell cycle in the cardiomyocyte differentiation process, and found that H0IL-1L-abnormal iPS cell-derived cardiomyocytes significantly accumulated in M-phase. These findings suggest that cardiomyocyte maturation abnormalities mediated by cell cycle regulation in H0IL-1L disorders may be part of the cause of cardiomyopathy.

研究分野：循環器

キーワード：心不全 H0IL-1L異常 ユビキチン化

## 1. 研究開始当初の背景

拡張型心筋症は心室拡大と心機能低下を認め、心臓移植の原因として最も多い。しかしながら拡張型心筋症の約半数は病因の特定が困難である。一方、家族性拡張型心筋症における原因遺伝子検索は徐々に進んでおり、家族性拡張型心筋症患者の約 20% に遺伝子変異が検出されるようになった。多くは直接心収縮に関連するサルコメアタンパクをコードする遺伝子や心収縮力を伝達する役割を担うジストロフィン関連タンパクをコードする遺伝子であるが、ミトコンドリア病や Fabry 病などの遺伝性代謝性疾患でも臨床的に類似した心筋症を認め心臓移植の適応となる。近年、グリコーゲン代謝(合成)に関わる glycogenin 変異や直鎖状コピキチン鎖合成複合体(linear ubiquitin assembly complex: LUBAC)の構成分子である HOIL-1L の変異で心筋症を発症し、高い確率で心臓移植が必要となる HOIL-1L 異常症が明らかとなった。HOIL-1L 遺伝子変異患者に関する最初の報告では、自己炎症性疾患症状と免疫不全・拡張型心筋症を呈する 3 例が報告され、1 例で心筋細胞への異常多糖類(アミロペクチン)蓄積を伴う拡張型心筋症が死因となった。その後もアミロペクチン沈着を伴う拡張型心筋症患者の多くで心臓移植が必要であったとの報告が続いている。以上の様に臨床所見と組織所見が判明していながらも、心筋症発症機序や心不全進行機序については未だ不明であり多くが重症心不全となる。HOIL-1L は HOIP、SHARPIN との 3 分子で LUBAC 複合体を形成し、タンパクの直鎖状コピキチン化を担っている。一般的なコピキチン化はタンパク質を分解に導くが、この直鎖コピキチンは、従来のタンパク質分解ではなく、アポトーシス抑制や NF- $\kappa$ B の活性化に働くことが報告されている。一方、LUBAC の構成分子の一つである HOIP の変異患者には心筋症を認めないことから、HOIL-1L 変異による心筋症発症には LUBAC の機能を介さず HOIL-1L が単独に関わっている可能性も示唆される。以上から HOIL-1L 異常症患者の心筋症発症に LUBAC 複合体を介した(または HOIL-1L 単独作用による)心筋細胞内アミロペクチン蓄積、それに引き続くアポトーシスや NF- $\kappa$ B の活性化を伴う心筋障害が生じていることが予測される。前述するように、本疾患の拡張型心筋症発症が実際、アミロペクチン蓄積やアポトーシス、NF- $\kappa$ B の活性化と関わるかどうか現在のところ不明であり、本研究で解明する予定である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、「HOIL-1L 異常症における拡張型心筋症発症機序の解明」である。過去報告では、HOIL-1L 異常によって直鎖状コピキチン鎖を介した NF- $\kappa$ B の活性化やアポトーシス抑制を起こすことが報告されている。一方、HOIL-1L は生体内で単独での作用を持つことが予想されており、コピキチン鎖の形成を触媒する作用や、転写因子として細胞周期・細胞増殖に関わるといわれている。以上の知見から HOIL-1L 遺伝子異常症における拡張型心筋症発症機序について、本研究の目的として以下 3 項目について主に注目する。

- ・アミロペクチン蓄積に誘発される細胞構造異常から起こる拡張型心筋症発症機序の解明
- ・アミロペクチン蓄積を起こす細胞内代謝異常に関連する拡張型心筋症発症機序の解明
- ・アポトーシスを含む細胞死による拡張型心筋症発症機序の解明
- ・細胞周期や細胞成熟の異常の関連する新規の拡張型心筋症発症機序の解明

## 3. 研究の方法

### 1) C2C12 を用いた骨格筋細胞内アミロペクチン蓄積機序の解明

HOIL-1L 遺伝子異常は過去 15 変異報告されており、この中で心不全症状が強く心臓移植に至った 2 遺伝子異常(c.896\_899delAGTG、c494delG)を選択し、CRISPR/Cas9 システムを用いて C2C12 から HOIL-1L 遺伝子ノックアウト株(C2C12-KO)を作製する。ノックアウトについては DNA sequence と Western blotting (HOIL-1L、HOIP、SHARPIN、LUBAC について)で遺伝子ノックアウトとタンパク発現低下を確認する。この C2C12、C2C12-KO 各々から骨格筋細胞を作製し、アミロペクチンの蓄積と構造を PAS 染色、電子顕微鏡観察、グルコース測定キットで同定する。また分化様式などを FACS や免疫染色法で経時的に評価する。次に RNA シークエンシングを行い C2C12、C2C12-KO 各々から分化させた骨格筋細胞内でのアミロペクチン蓄積に関わる原因代謝経路や遺伝子発現を特定する。同時に、C2C12、C2C12-KO 由来骨格筋細胞の分化や細胞周期、細胞死などの遺伝子発現についても比較する。

### 2) 疾患特異的 iPS 細胞由来心筋細胞を用いた心筋細胞内アミロペクチン蓄積機序の解明

患者由来の HOIL 異常ヒト iPS 細胞(HOIL-iPSC)とコントロール-iPS 細胞(Control-iPSC)から *in vitro* で心筋細胞分化を行う。また CRISPR/Cas9 システムを用いて Control-iPSC から上述と同じ 2 遺伝子異常のノックアウト株(HOIL-KO-iPSC)を作製する。ノックアウトについては上記同様方法で確認する。HOIL-iPSC、HOIL-KO-iPSC と Control-iPSC から分化した心筋細胞内のアミロペクチン蓄積と構造を上記同様に同定する。1)の結果から予測される心筋細胞の異常代謝経路の活性を qPCR や酵素測定で確認し、心筋細胞内アミロペクチン蓄積と蓄積に至る細胞内代謝経路の特定を行う。また作製した心筋細胞が心筋症としての特徴を有するか、免疫染色でのトロポニン構造の評価、電子顕微鏡でのサルコメア構造の評価、心筋細胞の大きさなどを評価

する。

### 3) iPSC 由来分化心筋細胞を用いた心筋症発症機序の解明

HOIL-iPSC、HOIL-KO-iPSC と Control-iPSC から分化させた心筋細胞について、アポトーシス・オートファジー含めた細胞死の亢進について WST-8 アッセイ、TUNEL 染色、Annexin V 染色や Caspase の発現、オートファゴソームの評価、GFP-LC3 アッセイなどによって評価する。また NF-

の活性化やサイトカインなどを測定して炎症と心筋障害との関わりについて評価する。心筋細胞分化過程における細胞周期の評価を FACS などを用いて行う。

## 4. 研究成果

C2C12、KO-C2C12 から分化させた骨格筋細胞において、PAS 染色で染色される物質が細胞内に存在したが、アミラーゼで容易に分解され、アミロペクチン蓄積は細胞レベルでの再現は困難であった。これら細胞からの骨格筋分化を詳細に検討すると、KO-C2C12 から分化させた骨格筋細胞で有意に分化効率が低下していた。FACS 解析では、骨格筋細胞の初期成熟マーカーの一つである MRF4 の発現が KO-C2C12 細胞から分化させた骨格筋細胞で有意に低下していた。C2C12、KO-C2C12 から分化させた骨格筋細胞を RNA シークエンシングで比較すると、細胞分化成熟、筋収縮、細胞周期、細胞線維化の遺伝子において有意差を認めた。

次に心筋細胞について評価を行った。HOIL-iPSC、HOIL-KO-iPSC と Control-iPSC から分化させた心筋細胞において、PAS 染色で染色される物質が細胞内に存在するが、アミラーゼで容易に分解され、アミロペクチン蓄積は C2C12 細胞の実験同様、細胞レベルでは再現困難であった。次に HOIL-iPSC、HOIL-KO-iPSC と Control-iPSC から分化させた心筋を観察すると、HOIL-iPSC と HOIL-KO-iPSC から分化させた心筋細胞は有意に大きく多核傾向であり、何らかの分化成熟異常が起こっていることが示唆された。次に、心筋細胞分化過程における細胞周期について評価したところ、HOIL-iPSC と HOIL-KO-iPSC 由来の心筋細胞では M 期の心筋細胞蓄積を有意に認めたことから、HOIL-1L 異常症における細胞周期制御を介した心筋成熟異常が心筋症発症の原因の一部である可能性が示唆された。HOIL-1L 遺伝子のヘテロノックアウトマウスにおいて HE 染色の評価では、胎児の心臓の構造的分化が遅延しており、ホモノックアウトマウスにおいては心臓発生が殆ど認めず胎生致死となった。

最後に、HOIL-iPSC、HOIL-KO-iPSC と Control-iPSC 由来心筋細胞の線維化について評価した。C2C12 細胞を用いた RNA シークエンシング結果では、細胞線維化に関わる遺伝子 *Serpine2* が C2C12-KO 由来骨格筋細胞で有意に上昇していた結果から、HOIL-iPSC、HOIL-KO-iPSC と Control-iPSC 由来心筋細胞の *Serpine2* 発現について評価するとともに、線維化マーカーについても評価した。結果、HOIL-iPSC と HOIL-KO-iPSC 由来心筋細胞で有意に *Serpine2* の発現が上昇しており、同時に線維化マーカーの亢進もみられた。

以上の結果から、HOIL-1L 遺伝子異常によって心筋細胞分化過程で細胞周期異常が起こり、分化成熟度が低い心筋細胞が作製され、その結果、心筋細胞の線維化が亢進し、心筋症発症に至る可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 赤木健太郎
2. 発表標題 H01L-1L遺伝子は細胞周期制御による心筋細胞成熟分化に影響し、その異常は拡張型心筋症発症の原因となる
3. 学会等名 日本小児心筋疾患学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤木健太郎
2. 発表標題 H01L-1L遺伝子は細胞周期制御による心筋細胞成熟分化に影響し、その異常は拡張型心筋症発症の原因となる
3. 学会等名 日本小児循環器学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤木健太郎
2. 発表標題 H01L-1L遺伝子は細胞周期制御による心筋細胞成熟分化に影響し、その異常は拡張型心筋症発症となる
3. 学会等名 西日本小児循環器研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤木健太郎
2. 発表標題 Revealing novel mechanisms of cardiomyopathy development by using H01L-1L deficiency iPS cells.
3. 学会等名 日本小児循環器学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤木健太郎
2. 発表標題 HO1L-1L retains differentiation capacity in skeletal muscles and cardiomyocytes assessed by C2C12 and human iPS cells
3. 学会等名 ISSCR, Boston USA (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤木健太郎
2. 発表標題 患者由来iPS細胞を用いたHO1L-1L欠損症における拡張型心筋症発症の機序解明
3. 学会等名 日本小児循環器学会
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