

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22928

研究課題名（和文）心筋細胞の増殖・再生に着目したデュシェンヌ型筋ジストロフィー心筋症の治療開発

研究課題名（英文）Development of treatment for duchenne muscular dystrophy cardiomyopathy focusing on cardiomyocytes proliferation and regeneration

研究代表者

安武 秀記（YASUTAKE, HIDEKI）

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：60748515

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）：DMD患者由来分化誘導iPS心筋及びジストロフィンを修復したゲノム編集分化誘導iPS心筋を用いて心筋の増殖・再生のメカニズムを検証した。本研究ではDMD患者由来分化誘導iPS心筋の増殖能の低下にYAPシグナルとジストロフィンがアンカリングするアクチンストレスファイバーが関与していることを示した。また増殖シグナルとしてNEK9を同定し、ジストロフィンアイタイプDp71がNEK9の発現に関与していることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DMD患者においてDMD心筋症による心不全が主な死因である。DMD心筋症に対しACE阻害剤や遮断薬などの薬物治療が存在するが、その効果は限定的であり、DMD心筋症に対する新たな治療法の開発が求められる。今回DMD患者由来iPS細胞を用いてDMD心筋症の進展機序に心筋の再生が関与することを提唱し、DMD心筋症に対する新たな治療法の開発に有用な知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：We have approached the proliferation and regeneration mechanism using iPS cell derived cardiomyocytes from DMD patient and genome edited iPS cell derived cardiomyocytes from DMD patient with repaired dystrophin protein. In this study, we showed YAP signal and actin stress fiber anchoring dystrophin protein are related to decreased proliferation ability of iPSC derived cardiomyocytes from DMD patient. And we identified NEK9 as proliferation signal and suggested dystrophin isoform Dp71 is associated with NEK9 expression.

研究分野：循環器内科学

キーワード：デュシェンヌ型筋ジストロフィー 疾患iPS細胞 心筋症

1. 研究開始当初の背景

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は *DMD* 遺伝子の変異によりジストロフィンが欠損し、骨格筋や心筋が障害される X 染色体連鎖疾患である。DMD 患者の多くが DMD 心筋症を発症し、DMD 心筋症による心不全が主な死因となっている。DMD 心筋症に対し ACE 阻害剤や β 遮断薬などの薬物治療が存在するが、その効果は限定的であり、DMD 心筋症に対する新たな治療法の開発が求められる。

DMD の病態として細胞内カルシウムの上昇による筋組織の壊死が報告されている。また同時に DMD の筋再生の障害により筋壊死が筋再生を上回り、筋組織が減少する。骨格筋においてサテライト細胞の異常による筋再生の障害が DMD の病態の一因であるが、再生能力が低い心筋において DMD 心筋症の進展機序に心筋再生が関与しているか詳細は不明であった。研究代表者は DMD 心筋症の進展機序に心筋の増殖・再生が関与していると仮説を立て、DMD 患者由来 iPS 細胞を用いて分化誘導 iPS 心筋を作成し、DMD 心筋症の病態解明を試みた。

2. 研究の目的

(1)DMD 心筋症に対し心筋の増殖・再生をターゲットにした治療開発を行うため、DMD 患者由来分化誘導 iPS 心筋を用いて心筋の増殖・再生に関与する増殖シグナルを探索する。

(2)ゲノム編集にてジストロフィンを修復した分化誘導 iPS 心筋を作成し、ジストロフィンが心筋の増殖・再生に関与する遺伝子発現に対し、どのような役割があるのかを調べる。

3. 研究の方法

(1)DMD 患者由来 iPS 細胞から CRISPR/Cas9 を用いてジストロフィンを修復したゲノム編集 iPS 細胞を作成した。これらの未分化 iPS 細胞を心筋に分化誘導し、DMD 患者由来分化誘導 iPS 心筋の増殖能を評価し、ジストロフィンが心筋の増殖・再生に関与するか調べた。

(2)心筋再生の増殖シグナルとして Hippo-YAP シグナルに着目し、DMD 患者由来分化誘導 iPS 心筋の YAP の核内移行を評価した。さらに YAP シグナルの制御に関与するアクチンダイナミクスをライブセルイメージングにより評価し、ジストロフィン、アクチンストレスファイバー、YAP シグナルの関与を調べた。

(3)分化誘導 iPS 心筋の増殖・再生に関与する増殖シグナルを RNA シーケンスにより網羅的に遺伝子探索し、さらに未分化 iPS 細胞と分化誘導 iPS 心筋のジストロフィンアイソタイプのパターンを解析し、ジストロフィンアイソタイプの増殖シグナルへの関与を調べた。

4. 研究成果

(1)Exon48-54 欠損のある DMD 患者由来 iPS 細胞に対し CRISPR/Cas9 を用いて Exon55 を切断し Exon48-55 欠損のあるゲノム編集 iPS 細胞を作成した(図 1)。ゲノム編集分化誘導 iPS 心筋においてフレームシフト変異によりジストロフィンが修復されたことを確認できた。Ki67 の発現により分化誘導 iPS 心筋の増殖能の評価を行ったところ DMD 患者由来分化誘導 iPS 心筋で増殖能の低下を確認できた。

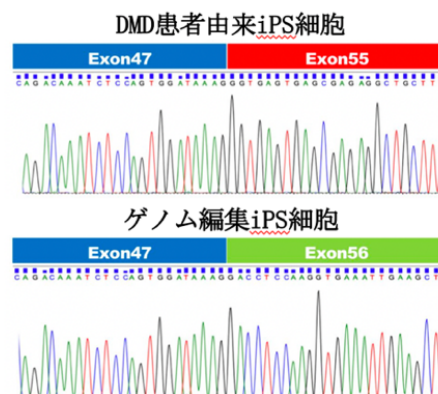


図1 ゲノム編集によるフレームシフト変異の確認

(2)ハイコンテンツイメージングシステムにて分化誘導 iPS 心筋の YAP の核内移行を検証する評価系を構築した。その評価系を用いて DMD 患者由来分化誘導 iPS 心筋で YAP の核内移行の低下を確認した。さらに YAP シグナルの制御に関与するアクチンストレスファイバーにジストロフィンがアンカリングしていることに着目し、分化誘導 iPS 心筋のアクチンダイナミクスをライブイメージングする系を構築した(図 2)。アクチンダイナミクスを定量評価したところ DMD 患者由来

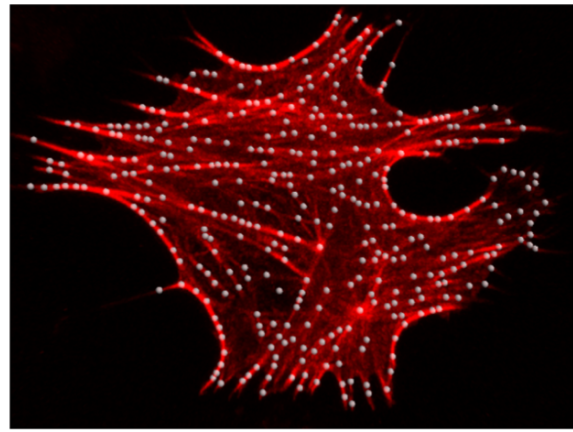


図 2 アクチンダイナミクスの定量解析

分化誘導 iPS 心筋でアクチンダイナミクスの活性が低下していることを確認した。これらの結果から DMD 患者由来分化誘導 iPS 心筋の増殖能の低下にアクチン-YAP シグナルの関与が示唆された。本研究成果は国際学術誌にて報告した (Yasutake et al, *Sci Rep* 2021)。

(3)分化誘導 iPS 心筋の増殖・再生に関与する増殖シグナルについて RNA シーケンスを用いて網羅的に遺伝子探索を行った。DMD 患者由来分化誘導 iPS 心筋とジストロフィンを修復したゲノム編集分化誘導 iPS 心筋の遺伝子発現を比較したところ、29 遺伝子に有意な変化(FDR<0.05)を認め、その中で増殖シグナルに関与する NEK9 が同定された(図 3)。一方で未分化 iPS 細胞の DMD 患者由来 iPS 細胞とゲノム編集 iPS 細胞の遺伝子発現を比較したところ、279 遺伝子に有意な変化 (FDR<0.05) を認めた。

DMD 患者由来分化誘導 iPS 心筋とゲノム編集分化誘導 iPS 心筋の比較による 29 遺伝子と未分化 iPS 細胞の DMD 患者由来 iPS 細胞とゲノム編集 iPS 細胞の比較による 279 遺伝子のうち共通する遺伝子は NEK9 を含む 23 遺伝子であった。この共通する 23 遺伝子にジストロフィンアイソタイプが関与するか調べた。DMD 患者由来 iPS 細胞とゲノム編集 iPS 細胞の未分化 iPS 細胞及び分化誘導 iPS 心筋においてジストロフィンアイソタイプ Dp71 のユビキタスな発現を認め、Dp71 が NEK9 の発現に関与していることが示唆された。

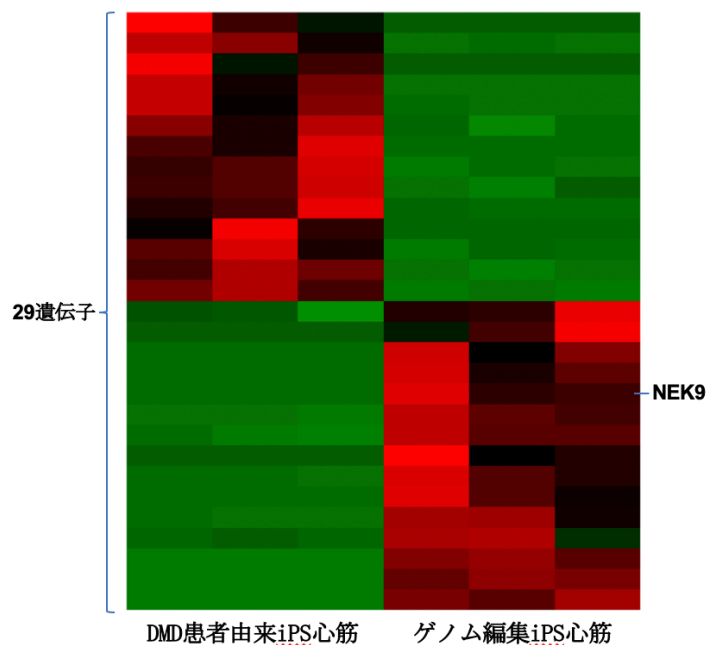


図3 RNAシーケンスによる網羅的解析

本研究において DMD 患者由来 iPS 細胞を用いて DMD 心筋症の病態に心筋の増殖・再生が関与している可能性が示唆された。これらの知見により DMD 心筋症における新たな病態メカニズムを提唱し、DMD 心筋症に対する治療法の開発に繋がることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hideki Yasutake, Jong Kook Lee, Akihito Hashimoto, Kiyoshi Masuyama, Jun Li, Yuki Kuramoto, Shuichiro Higo, Shungo Hikoso, Kyoko Hidaka, Atsuhiko T. Naito, Shigeru Miyagawa, Yoshiki Sawa, Issei Komuro, Yasushi Sakata	4. 巻 11
2. 論文標題 Decreased YAP activity reduces proliferative ability in human induced pluripotent stem cell of duchenne muscular dystrophy derived cardiomyocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-021-89603-8	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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------