

令和 5 年 4 月 26 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16030

研究課題名（和文）多能性幹細胞とCRISPRスクリーニングを用いた拡張不全型心不全の治療標的探索

研究課題名（英文）Discovery of Therapeutic Targets for Heart Failure with Preserved Ejection Fraction using CRISPR/Cas9 Technology and Human Pluripotent Stem Cells.

研究代表者

木谷 友哉（Kitani, Tomoya）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：30842257

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト心筋細胞を用いたCRISPR遺伝子スクリーニングに成功し、拡張不全型心不全の治療に有望な候補遺伝子群を特定した。しかし、多能性幹細胞から誘導された心臓線維芽細胞に関しては安定的な培養が困難であり、今後最適化が必要であることが判明した。本研究ではヒト心筋細胞を大量に作出し、遺伝子スクリーニング実験を実施することが可能であることが明らかとなり、また得られた候補遺伝子群には心不全の病態形成への関与が報告されていない遺伝子が含まれており、将来の拡張不全型心不全に対する新規治療法開発の基盤となる成果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦を含めて全世界的に社会の高齢化に伴う心不全患者の増加が予想されており、新たな心不全治療の開発は急務である。しかし、高齢者の心不全の主体である拡張不全型心不全に有効な治療法は未だ確立しておらず、その病態も不明な点が数多く残されている。本研究ではヒト多能性幹細胞より心臓構成細胞を作出し、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を行い、拡張不全型心不全の病態に寄与する遺伝子の候補の探索を実施した。本研究により将来の治療標的候補となりうる分子機序を解明する研究を実施する上で極めて重要な情報が得られたことから、学術的社会的意義に富む結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：We succeeded in CRISPR screening using human cardiomyocytes derived from pluripotent stem cells and identified promising candidate genes which could contribute to the development of heart failure due to diastolic dysfunction. However, we also found that stable cultivation of cardiac fibroblasts induced from pluripotent stem cells was difficult and further optimization is necessary. The candidate genes obtained in this study included genes that have not been reported to be involved in the pathogenesis of heart failure, which could be novel targets for future research to develop novel treatments for heart failure due to diastolic dysfunction.

研究分野：循環器疾患

キーワード：心不全 心筋細胞 心筋線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

本邦を含めて全世界的に社会の高齢化に伴う心不全患者の増加が予想されており、新たな心不全治療の開発は急務である。しかし、高齢者の心不全の主体である拡張不全型心不全に有効な治療法は未だ確立しておらず、その病態も不明な点が数多く残されている。

しかし、実験動物モデルを用いてヒトの病態を正確に再現することは困難あること、患者由来の組織では基礎疾患や年齢性別などの背景があまりにも多様であること、いずれの手法を用いた研究であっても疾患に寄与する要因の網羅的・前向きな検討は実行に多大な労力を要することからこれらの研究手法には限界も指摘されている。

2. 研究の目的

本研究ではヒト多能性幹細胞より心臓構成細胞を作出し、**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を行い、拡張不全型心不全の病態に寄与する遺伝子の候補を網羅的に探索することで、新規治療標的となりうる分子生物学的機序を明らかにすることを目的として研究を実施する。

3. 研究の方法

(1) ヒト多能性幹細胞の培養と各細胞への分化誘導

ヒト多能性幹細胞 (**SCVI-116, SCVI-273**) は **Stanford University Cardiovascular Institute Biobank** (<https://med.stanford.edu/scvibiobank.html>) より提供を受け、ノンフィーダー環境において **Essential 8** 培地にて維持培養を行った。多能性幹細胞より心臓線維芽細胞および心筋細胞への分化は各々既報に基づいた指向性分化法を用いて実施した (**Kitani T, Circulation. 2019., Zhang H, Circ Res 2019.**)。

(2) 心臓構成細胞を標的とした **CRISPR** ノックアウトスクリーニング

全キナーゼを標的とした遺伝子ノックアウト **Cas9** レンチウイルスプールライブラリー (**Brunello Human CRISPR Knockout Pooled Library, addgene plasmid #75314, 73179**) より作出したレンチウイルスベクターを **MOI = 0.4** で導入し、5日間 **Puromycin** による薬剤選択を実施し、実験に使用した。引き続き回収した細胞より **NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel)** を用いてゲノム **DNA** を回収し、**3step-PCR** にてライブラリーを調整した。調整したライブラリーは **NovaSeq6000** を用いてシーケンシングされ、**Cutadapt** にてアダプター配列を取り除いた後、**Brunello library gRNA** 配列情報に基づいてアライメントを行い、**MAGeCK** プログラムを用いて各遺伝子における **RRA** スコアを算出した。

4. 研究成果

(1) ヒト多能性幹細胞由来心臓線維芽細胞を用いた **CRISPR** スクリーニング

ヒト多能性幹細胞より **Wnt** パスウェイ関連低分子化合物およびレチノイン酸を用いて心外膜系譜細胞を誘導し、線維芽細胞成長因子を用いて心臓線維芽細胞への誘導をおこなった(図 **1A**)。光学顕微鏡による観察では多能性幹細胞から心外膜細胞様の敷石状の形態への変化、さらに紡錘形状の線維芽細胞様への形態変化が観察された(図 **1B**)。次に誘導した細胞、ヒト多能性幹細胞および健康人骨髄由来間葉系幹細胞 (**MSC, Lonza, PT-2501**) より **Direct-zol RNA Kit (Zymo Research)** を使用して **total RNA** の抽出を行った。回収した **RNA** より **PrimeScript RT reagent Kit (Takara)** を用いて逆転写を行い、**CFX 384 Real-Time system (Biorad)** にて **KAPA SYBR FAST qPCR kit** を用いて遺伝子発現の評価を行なった。誘導した細胞の遺伝子発現プロファイルでは多能性マーカーである **NAONG** の著名な低下、および心臓線維芽細胞のマーカー (**TCF21, TBX20, GATA4**) の上昇が認められた(図 **1C**)。さらに、心臓線維芽細胞のマーカーとして報告されている **DDR2 (Santa Cruz, sc-81707)** を用いてフローサイトメトリーにてほぼ全ての細胞で **DDR2** 陽性であることが認められた(図 **1D**)。以上より報告通り心臓線維芽細胞が誘導されたと判断し、上記の記載に基づき **CRISPR** スクリーニングを実施したものの、分化誘導後二週間目ほど経過すると徐々に紡錘形状から敷石状細胞へ細胞形態変化が生じることが観察されたため、スクリーニング実験は保留とした。

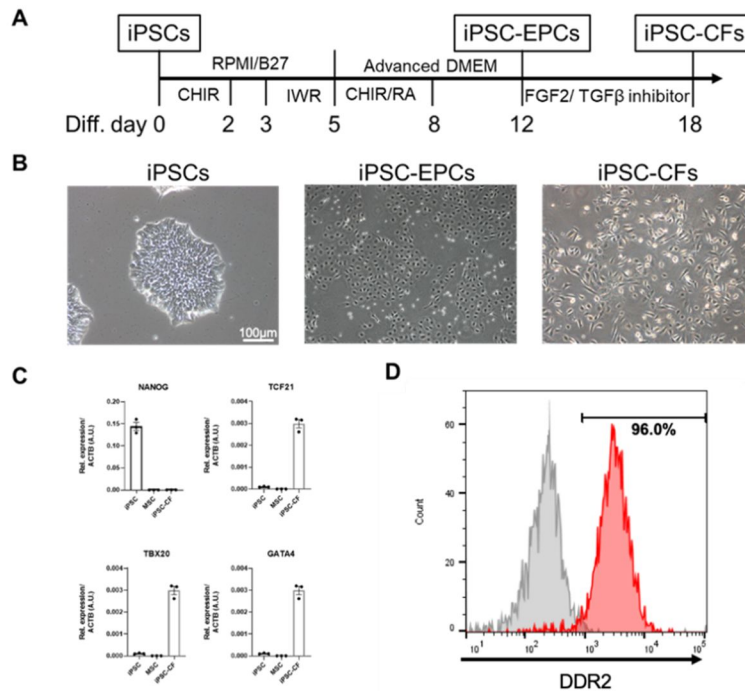


図 1. ヒト多能性幹細胞から心臓線維細胞への分化誘導

A) ヒト多能性幹細胞よりの心臓線維芽細胞の誘導の概略図。B) 分化誘導中の細胞形態の明視野像。iPSCs; iPS 細胞, iPSC-EPCs; iPS 細胞由来心外膜細胞, iPSC-CFs; iPS 細胞由来心臓線維芽細胞。C) リアルタイム PCR による多能性幹細胞マーカー (NANOG) および心臓線維芽細胞マーカー TCF21, TBX20, GATA4 mRNA 発現の比較。MSC; 健康人骨髄由来間葉系幹細胞。D) iPSC-CFs における心臓線維芽細胞のマーカー DDR2 の発現評価。Gray; Isotype control, red; DDR2。

(2) ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞を用いた CRISPR スクリーニング

引き続き心筋細胞を用いた CRISPR スクリーニングを実施するために、ヒト多能性幹細胞から誘導した心筋細胞の増殖培養を実施した。多能性幹細胞から誘導したばかりの幼弱心筋を低密度下、Wnt シグナル活性化の条件で培養を行ったところ、心筋細胞の継続した増殖を確認することができた (図 2A, B)。増殖後の細胞集団をメタノールで固定後、心筋トロポニン T (abcam, ab45932, 1:200) を用いてフローサイトメーターによる評価を実施し、高純度の心筋細胞が得られていることを確認した (図 2C)。引き続き、これらの心筋細胞に上記の方法に基づきウイルス導入後 14 日後に 10 mM glucose、10 nM h-endothelin-1、1 μM cortisol にて 3 日間刺激を行った。その後 Brefeldin A にて 3 時間細胞を処理後に細胞を固定し、抗 NT-proBNP 抗体 (abcam, ab13115, 1:500) および抗 TNNT2 抗体にて免疫染色を実施し、フローサイトメーターにて TNNT2 陽性集団より NT-proBNP の強/弱信号分画の細胞を各々全分画の 20% を目標として回収した (図 2D)。スクリーニングは独立して計 4 回実施し、総合的な RRA スコアを最終的に算出した (図 2E)。

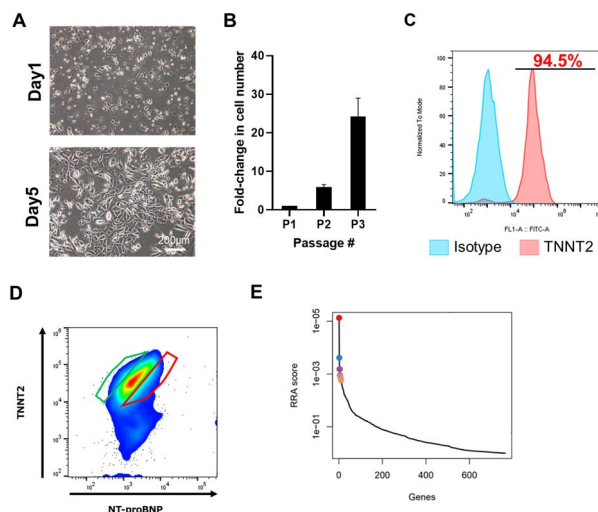


図 2. ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞の増殖培養と CRISPR スクリーニング

A) 分化誘導終了後の幼弱心筋培養を再播種後 1 日目と 5 日目の顕微鏡写真。**B)** 継代毎の心筋細胞数の変化。**C)** 3 継代目 (**P3**) の心筋細胞純度を心筋トロポニン **T (TNNT2)** を用いてフローサイトメトリーにて評価した。**D)** 代表的な **TNNT2** および **NT-ProBNP** によるフローサイトメトリーによる細胞ソーティングの結果。**E)** **RAA** スコアによる遺伝子ランキングの結果。

以上の研究によりヒト心筋細胞において **CRISPR** 技術に基づいたスクリーニングを実施した結果、新規の拡張不全型心不全の治療標的となりうる候補遺伝子リストを作成することに成功した。引き続きこれら候補リストの遺伝子が心不全の病態形成にどのように寄与しているのかを解明し、治療標的として優れた候補を絞り込み、治療法の開発へ向けて研究を展開する予定である。

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 1件）

1. 発表者名 Tomoya Kitani
2. 発表標題 Disease Modeling and Translational Research for Cancer Therapeutics-Related Cardiac Dysfunction using Human Pluripotent Stem Cells
3. 学会等名 39th Annual Meeting of the ISHR-Japanese Section
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoya Kitani
2. 発表標題 CRISPR-Cas9 Screen in Human Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes Reveals Therapeutic Target for Doxorubicin-induced Cardiac Dysfunction
3. 学会等名 第26回日本心不全学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoya Kitani
2. 発表標題 A CRISPR Screen in Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Identifies a Novel Therapeutic Target for Doxorubicin-induced Cardiotoxicity
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
---------	---------