

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム事業
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名:

(日本語) 難治性心筋症疾患特異的 iPS 細胞を用いた集学的創薬スクリーニングシステムの開発と実践

(英語) Drug discovery via development of multidisciplinary drug screening system by using disease specific-iPS cells derived from refractory cardiomyopathy.

研究開発実施期間: 平成29年8月29日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 宮川 繁

(英語) Shigeru Miyagawa

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 国立大学法人大阪大学・大学院医学系研究科・教授

(英語) Professor, Department of Cardiovascular Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine

II 研究開発の概要

I. 研究の要約

特発性心筋症は、治療抵抗性のため極めて予後不良であり、有効な治療薬の開発は喫緊の課題である。最近の遺伝子解析の進展により、原因遺伝子によって病態は大きく異なることがわかってきており、原因遺伝子に基づいた病態解明と治療法開発が必要である。本課題では原因遺伝子による層別化を行い、疾患特異的 iPS 細胞を用いることが有用である疾患群を同定し、対象症例を選定した。遺伝子編集技術を用いた病態解明、iPS 細胞由来心筋細胞の成熟度向上、均一化技術、品質管理技術、人工知能による新規細胞解析技術を駆使し、病態解明の実験系を構築した。これを用いて病態を反映した心筋症創薬スクリーニング系のバリデーションを実施した。

II. 評価項目

	6年目終了時の達成目標	達成概要
1. 発表論文	12 報発表済み	43 報発表済み
2. 疾患特異的 iPS 細胞の樹立と寄託	樹立 42 株、寄託 42 株	樹立株 54 株、寄託株 38 株 寄託した細胞と同一変異または類似変異 20 症例のゲノム情報を、理研に寄託した細胞株と紐づけ

		て NDBC に寄託した。
3. 研究開発の成果の企業・他支援プログラム等への移行	2 件	3 件（予定 1 件）
4. 拠点内外の支援先	1, 2 件	2 件
5. スクリーニング系のバリデーションを構築	提案した 5 疾患	4 疾患で構築した

III. 進捗状況

1. 遺伝性心筋症遺伝子解析、疾患特異的 iPS 細胞の樹立、疾患病態解明

1) PKP2 変異による不整脈原性右室心筋症症例

発端者は不整脈原性右室心筋症 (ARVC) 症例で、遺伝子解析により PKP2 (プラコフィリン 2) 遺伝子におけるヘテロ接合型フレームシフト変異 (1228dupG、D410fsX425) が同定された。PKP2 は細胞間接着を担うデスモゾームにおいて、デスモグレイン 2 (DSG2)、プラコグロビン、デスモプラキンと協調し、細胞構造保持に関わるとされていることから、表現型が組織構造の強度、ならびに電気伝導性に強く顕れるものと予想されこれらを中心に解析した。

本症例から iPS 細胞を樹立し、品質確認、心筋細胞への分化能の確認を実施した。さらにこの iPS 細胞株をもとに遺伝子編集技術を用いて変異を修復した株 (修復株)、両アレルにフレームシフト変異を挿入したホモ接合型変異株を作製し、これらの細胞セットを用いて解析を行った。

心筋細胞に分化誘導し PKP2 の発現を評価したところ、ホモ変異株由来心筋細胞においては PKP2 の発現が欠失するのみならず、他のデスモゾームタンパクの発現も減少し局在性を失っていること、さらに透過型電子顕微鏡観察により介在版構造が破綻していることを示した。更にゲノム編集を行い、DSG2 遺伝子の下流に赤色蛍光タンパク遺伝子を挿入することで、デスモゾームをライブイメージングにより観察することができる細胞を構築した。PKP2 遺伝子補充により DSG2 発現が経時的に回復することを見出し、以上の成果を論文報告した (Inoue et al, Stem Cell Reports. 2022)。ラマン散乱スペクトル計測を実施し、主成分解析により遺伝子型が判別できることが明らかになった。また、デスモゾーム動態を判別する AI アルゴリズムを構築するとともに、DSG2 発現量を回復し得る薬剤を見出した。

2) DSG2 変異による拡張型心筋症症例

発端者は重症心不全を呈した拡張型心筋症症例である。遺伝子解析により DSG2 のホモ接合型変異 (R119X) が同定された。DSG2 は細胞外ドメイン、膜貫通領域、細胞内ドメインからなるタンパク質で、PKP2 などと協調して細胞間接着を介した細胞構造保持を担う。本症例の病理検査において、本タンパク質の発現が完全に欠損しており、細胞間接着構造の破壊、心筋内空胞変性、デスモコリンの発現低下、デスモゾーム関連タンパク質の局在異常を認めた。

本症例から iPS 細胞を樹立し、品質確認、心筋細胞への分化能の確認を実施した。さらにこの iPS 細胞株をもとに遺伝子編集技術を用いて変異を修復した株 (修復株) を作製し、これらの細胞セットを用いて解析を行った。分化誘導により作製した心筋細胞を組織化したところ、ホモ接合型変異株から作成した心筋組織は脆弱であり、修復株由来心筋組織において収縮力が回復すること、また DSG2 遺伝子補充により収縮力が回復することを見出し、論文報告した (Shiba et al, Hum Mol Genet. 2021)。DSG2 タンパク質発現を回復し得る化合物を見出し、機能解析を実施した。また、本 iPS 分化心筋から構築した三次元心筋組織化リングを用いた共同研究を実施し、新規薬剤の薬効評価を行い論文報告した (Hitsumoto et al, Circulation. 2023)。

3) MYBPC3 変異による肥大型心筋症症例

発端者は拡張相肥大型心筋症症例であり、遺伝子解析の結果 myosin binding protein 3 (MYBPC3) 遺伝

子におけるヘテロ接合型フレームシフト変異が同定された。

本症例から iPS 細胞を樹立し、品質確認、心筋細胞への分化能の確認を実施した。さらにこの iPS 細胞株をもとに遺伝子編集技術を用いて変異を修復した株（修復株）、両アレルにフレームシフト変異を挿入したホモ変異株を作製し、これらの細胞セットを用いて解析を行った。

MYBPPC3 変異 iPS 由来心筋細胞はサルコメアの錯綜構造が確認された。三次元心筋組織リングを作成し、解析をしたところ、ホモ変異株において修復株と比して著明な収縮力低下を認めた。また、第二高調波顕微鏡を用い、生細胞においてアクトミオシン活性率を計測できる技術を用いて、アクトミオシン活性を測定したところ、変異株におけるアクトミオシン解離阻害、収縮力の増加の表現型、ならびに修復株における表現型の回復を確認した。さらに本技術を用いて薬剤添加による表現型の変化を検出することが可能であった。

一方、MYBPC3 変異症例 iPS 細胞由来心筋細胞セットそれぞれの RNA を用いて RNA-seq 解析を行い、遺伝子発現の比較を行い変動した遺伝子を抽出し、遺伝子オントロジー解析やパスウェイ解析を行い、特定の遺伝子群・パスウェイに関する遺伝子の発現が変動していることを明らかにした。肥大型心筋症の変異を持つ iPS 細胞由来心筋細胞を用いてシングルセルおよびバルクサンプルの網羅的遺伝子発現データを解析し、健常の細胞と疾患の細胞で変動するモジュールを同定した。これらの遺伝子には心筋関連遺伝子が多く含まれており、肥大型心筋症の進展に関連する因子が多く含まれていると考えられる。

また、MYBPC3 変異株および修復株由来心筋細胞を二次元組織として培養し、その収縮特性に対するミオシン阻害薬の MYK461 (Mavacamten) の効果を調べた。その結果、MYBPC3 ホモ変異株では修復株に比べて収縮速度の増大を含む過収縮が観察され、MYK461 添加で、過収縮の改善が見られた。2 次元培養系での表現型は比較的未成熟な段階を反映していることから、本疾患の初期病態を反映している可能性が考えられ、早期段階の介入の有用性が示唆された。

4) TNNT2 変異による拡張型心筋症症例

発端者は拡張型心筋症症例である。遺伝子解析により、本症例ではトロポニン (TNNT2) 遺伝子におけるアミノ酸欠損のヘテロ変異 (ΔE160) が同定された。

本症例から iPS 細胞を樹立し、品質確認、心筋細胞への分化能の確認を実施した。さらにこの iPS 細胞株をもとに遺伝子編集技術を用いて変異を修復した株（修復株）、両アレルに変異を挿入したホモ接合型変異株を作製し、これらの細胞セットを用いて解析を行った。

これらアイソジェニック iPS 細胞を心筋に分化させ解析したところ、トロポニン T Δ160E 変異はサルコメア局所でのカルシウム濃度の減衰時間を延長させるとともに、拡張速度を低下、弛緩時間を延長させた。更に、活動電位持続時間を延長させ、NFATc1 の核内移行、心筋肥大、CaMKII δ・ホスホランバンリン酸化の亢進を来すことが明らかとなった。エピガロカテキンガレートに Δ160E 心筋に投与したところ、カルシウム濃度減衰時間を短縮させ、拡張機能を改善させることが明らかとなり、以上成果を論文報告した (Kondo et al, Circ Genom Precis Med. 2022)。

5) TNNT3 変異による拡張型心筋症症例

当初予定していた症例からは複数回施行したものの、初期化細胞が得られず難渋した。別の変異症例を新たにリクルートし樹立を試みたところ、樹立が確認された。本症例では、TNNT3 遺伝子における片アレルのアミノ酸欠失変異が同定された。TNNT3 変異 iPS 細胞由来心筋細胞の表現型について、正常 iPS 細胞由来心筋細胞と比較することで検討を行った。それぞれの iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞を用いて組織化を行い、三次元心筋組織リングの形成と進行波の誘発や収縮力を確認したところ、正常株由来心筋細胞に比べ、TNNT3 変異心筋細胞においては進行波の伝播速度や収縮力の低下が認められた。さらに収縮力に関与する複数の遺伝子、タンパク質の発現低下を認めた。

6) 心筋症ゲノムデータベースの構築

iPS 細胞株を樹立した患者が疾患変異を有する各遺伝子について、各々の遺伝子内の類似変異をリスト化し、健常人コホートゲノム情報から一般の頻度情報を算出するとともに、1800 例の心筋症ゲノムデータベースから類縁バリエント保有症例を抽出し、本事業の知見を還元可能な対象患者群の同定を行った。遺伝性心筋症約 1000 例について全ゲノム領域で一塩基多型の情報を取得、リファレンスデータを参照にゲノム配列の高精度な推定を行い、各遺伝子変異の病原性への寄与度を計算し、心筋症の層別化を行うアルゴリズムを作成、論文作成中である。また、心筋症患者の臨床検体を用いて原因遺伝子変異と遺伝子発現プロファイル変化の局在性が一致していることを見出し、ゲノム情報による層別化が妥当であることを確認した。これらのデータのうち、理化学研究所に寄託した iPS 細胞を提供した心筋症患者の原因遺伝子変異と同じ遺伝子上に同一変異、ないし同程度に病原性のある変異を有する心筋症患者のゲノム情報 20 症例のゲノム情報は、寄託細胞と紐づけを行ったうえでバイオサイエンスデータベースセンター (NBDC) に寄託した。

2. 疾患特異的 iPS 細胞および iPS 細胞由来心筋細胞の品質管理、分化心筋細胞の成熟度の向上、均一化

1) サブタイプ分化誘導法の開発

心筋細胞の分化誘導方法において、サイトカインの量を調整することでヒト iPS 細胞からサブタイプ特異的な分化誘導法の確立を行い、遺伝子発現解析 (RT-PCR 法・免疫染色など) およびパッチクランプ解析法や膜電位感受性色素法を用いた活動電位の解析をすることによりサブタイプの評価を行い、高効率で心室筋が誘導可能であることを確認した。下記のマイクロ RNA スイッチ法と組み合わせることにより心室筋・心房筋・洞結節細胞を高純度で作製する方法を確立した (TsujiSaka et al. Stem Cell Reports 2022)。

2) マイクロ RNA スイッチ法技術の研究開発

合成 RNA をもちいて特異的な miRNA が発現する細胞を選別する技術であるマイクロ RNA スイッチ法と MACS ソーティング法を組み合わせることにより、大量の心筋細胞の精製にも応用可能な技術の開発を行った。同精製法は FACS のソーティング法と比較して大量の心筋細胞を短時間で精製可能であり、他の方法で精製された心筋細胞と同等の遺伝子発現プロファイルを示し、かつ精製後の生存率も良好であることを確認し、論文発表を行った (TsujiSaka et al. Stem Cell Reports 2022)。

3) 疾患特異的 iPS 細胞由来心筋細胞の成熟度・均一性の向上技術の開発

HAND1, HAND2 発現をモニターできるレポーター iPS 細胞を用いて、分化した心室筋細胞において HAND1 高発現細胞は増殖性の高い細胞であり、CD105 がそのマーカーとなることを明らかにした (Okubo et al. Stem Cell Reports 2021)。また心筋細胞の成熟誘導法として ERR γ 作動薬の処理により心筋細胞を成熟化させる方法について報告を行った (Miki et al. Nat Commun. 2021)。

4) ラマン散乱分光顕微鏡による細胞状態識別技術

ラマン散乱スペクトルの解析手法を考案した。主成分解析では、取得したラマン散乱スペクトルは、各細胞株でクラスターを形成するものの、それらを精度よく判別するには不十分な差異であった。そこで、深層学習 (オートエンコーダー) を用いた判別法を試行した。部分最小二乗法 (PLS) を基本とした機械学習モデルを用いて、ラマン散乱スペクトルデータと RNA シーケンスデータの相関クラスタリングを実施したところ、データ対は主に三つのクラスターを形成しており、それぞれについて、寄与遺伝子群および関連機能を推定できた。特に、Oct4 と Sox2 の未分化維持関連転写因子と細胞骨格因子アクチンフィラメントの重合に関連があることが推定された。アクチンフィラメントと細胞核がネスプリンと言うタンパク質により架橋されており、この架橋が未分化維持関連転写因子の発現を促進させていることが明らかとなり、本手法の妥当性が確認された。また、定量 PCR における標準遺伝子の発現が揺らいでいることも発見され、それを補正するアルゴリズムを考案した。

ヒト iPS 細胞において、ラマン散乱スペクトルが iPS 細胞の疾患特異性を反映するか検証した。ヒト iPS 細胞株 17 株間の未分化状態においては、ラマン散乱スペクトルに大きな違いは認めず、体細胞が iPS 化されることにより、病態が表現されるより前の状態に戻る可能性を示唆した。一方、6 種類のヒト iPS 細胞株（健常者由来 2 株、疾患由来 4 株）それぞれの心筋分化過程（6 時点）からサンプリングし、ラマン散乱スペクトルを収集し解析を行ったところ、やはり、iPS 細胞の状態では株間にラマン散乱スペクトルにおける顕著な差は確認できなかった。一方で、心筋分化誘導に伴い株間で差を認め、経時的に差が増大した。取得されたラマン散乱スペクトルデータを判別分析により解析したところ、ラマン散乱スペクトルで定義される状態空間において、これら iPS 細胞は、同じ分化経路を通過しており、由来する疾患の種類により遷移する時間が異なっていることが示唆された。

上記にて開発した方法を PKP2 ならびに MYBPC3 変異症例由来株の評価に適用した。

5) 光第二高調波（SHG）顕微鏡による心筋機能の成熟度評価技術

分担者らは、第二高調波（SHG）によって繊維性タンパク質の構造相違を定量的に計測できる技術をすでに確立している。本研究課題では、コラーゲン繊維の含有量・構造、サルコメア構造、アクトミオシンの活性化率、微小管繊維の構造を定量できる物理パラメータを計測する技術の開発を行った。サルコメア構造がほぼ一方向になるように細胞を線上にパターンニングできる基板を作製し、これを用いてサルコメア内のアクトミオシン活性の評価に使える物理パラメータの抽出に成功した。計測プロトコルの確立と自動解析ソフトウェアを構築した。

さらにこれらの技術を拡張し、生細胞においてアクトミオシン活性率を計測できる技術を確立し、疾患特異的 iPS 細胞およびその派生株を用いてアクトミオシン活性の計測を実施した。

3. 疾患特異的 iPS 細胞由来心筋細胞を用いたスクリーニング系の確立

1) ハイスループットスクリーニング系の開発

疾患メカニズム解明および創薬に利用可能なシステム開発のために、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用い、機能解析によるハイスループットスクリーニングシステムを構築した。ライブセルイメージングシステムによる活動電位、細胞内 Ca トランジェントを計測し、（拡張期）細胞内 Ca レベルおよび種々の生理活性物質が細胞内 Ca レベルに与える影響を調べた。また、イソプロテレノール添加後の細胞肥大刺激効果に対する生理活性物質の効果をハイコンテンツイメージングシステムにより解析した。上記に加え、多電極アレイ・細胞スキャナー・セルモーションアナライザーを用い、非染色で細胞機能・形態（2次元）の解析システムを構築した。

2) ラマン散乱分光顕微鏡による細胞状態識別技術

分担者において既に確立済みである細胞が発するラマン散乱スペクトルから細胞の種類や状態を識別する技術を用い、ハイスループット化を行った。少なくとも一時間以内に 120 細胞のデータ取得を目標とした。低倍率（広視野）にて各細胞の配置を取得し、細胞を操作する距離が最短になるよう走査することで、従来のようにステージをラスト走査しながら細胞探索する方法に比べ 10 倍以上の高速化が実現され、120 細胞/時間は達成された。また、しばしば低再現性が問題となる細胞のラマン散乱スペクトル計測に対して、それを克服する解析アルゴリズムを開発した。

3) 人工知能を用いた解析

培養状態の iPS 由来心筋細胞の位相差顕微鏡画像を取得し、細胞の分化率に従って画像分類を行う AI を作成した。ヒト iPS 細胞株を心筋へ分化させ、分化率はフローサイトメーターで解析し、教師データとした。画像分類を行う AI として、画像認識コンテスト (ILSVRC) で高い成績を収めたアルゴリズム (VGG16 や GoogLeNet など) の実装を行なった。AI による判別により、分化率の高低をおよそ 90% 程度の正答率で分類することに成功した。

また深層機械学習を用いた評価系を樹立した。PKP2 のアイソジェニック iPS 分化心筋のデスマグレイ
ン2 イメージング画像について、患者由来 (C5)、変異を修復したもの (F4)、変異を逆に両アレルに導入
したもの (E9) を用意した。畳み込みニューラルネットワークを用いて画像分類を行ったところ、E9, C5,
F4 の3クラス分類においてテストデータに対して 90.3% の正答率を得た。また、Grad-CAM++ を用いるこ
とで、AI が画像分類を行う際にデスマグレイン 2 に由来する輝点や細胞膜に注目していること可視化
した。

IV. 英語要約

Idiopathic cardiomyopathy has an extremely poor prognosis due to resistance to treatment, and the development of effective therapeutic agents is in urgent need. Recent advances in genetic analysis have revealed that the pathogenesis of idiopathic cardiomyopathy varies greatly depending on the causative gene, making it necessary to elucidate the pathogenesis and develop treatment based on the causative gene. In this project, we stratified patients by causative genes, identified disease groups for which the use of disease-specific iPS cells would be useful in selected target cases. We constructed an experimental system for disease elucidation using gene editing technology, maturation improvement of iPS cell-derived cardiomyocytes, homogenization technology, quality control technology, and novel cell analysis technology based on artificial intelligence. Using this system, we conducted validation of a cardiomyopathy drug screening system that reflects the pathophysiology of the disease. We published 43 papers in this project and deposited 38 disease-specific iPS cell lines with clinical information of patients at public institutions. In addition, genome information of 20 cases with the same or similar mutations were deposited at the public institution in association with the deposited cell lines. Research and development was transferred to four other research projects, and support was provided to two other projects. Validation of the screening system was constructed with the four mutation among the five gene mutations.

Patient-derived iPS cells were established in all five mutations. In four of the mutations, isogenic control lines were generated using genome editing technology, allowing precise evaluation of the effect of the genetic mutation on the phenotype. In addition, we analyzed the phenotypes and examined the effects of known drugs on the phenotypes.

Furthermore, for each gene with causative pathogenic variants detected in patients from which iPS cell lines were established, we extracted cases with analogous variants from the Cardiomyopathy Genome Database of 1800 cases, and identified a target patient group to which the findings of this project could be applied.

In parallel, we developed subtype-specific differentiation and maturation promotion methods for cardiomyocytes. We also constructed an experimental system to analyze and evaluate phenotypes that could not be detected previously using Raman cellular fingerprinting, structure analysis by utilizing second harmonic generation, and artificial intelligence. In addition, three dimensional heart tissue models were also established to evaluate the organization, morphology and contractile force of the patient derived cardiomyocytes.