

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

I 基本情報

研究開発課題名：心筋症に対する遺伝子治療効果の予測手法の開発と実証

Development and validation of a prediction method for gene therapy of cardiomyopathy

研究開発実施期間：令和3年10月20日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名：魚崎 英毅

Hideki UOSAKI

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

学校法人自治医科大学 分子病態治療研究センター 再生医学研究部 准教授

Jichi Medical University, Center for Molecular Medicine, Division of Regenerative Medicine, Associate Professor

II 研究開発の概要

【概要】

我々は心筋症に対する遺伝子治療の開発を進めている。心筋症では様々な遺伝子において変異が同定されているが、多くがミスセンス変異である。そのため、ナンセンス変異と異なり、遺伝子を再度発現させれば有効であるとは限らない。そのため本研究では *in vitro* で遺伝子治療効果の判定を行う新しい手法の確立を目指して研究を行った。具体的には、iPS 細胞由来心筋細胞を用いた新しい心筋症の病態モデルの開発と、その病態モデルに基づく遺伝子治療の可能性の探索を行った（魚崎班）。さらに、実際に遺伝子治療を行い、*in vitro* の結果と比較するためのマウスモデルの作出し（魚崎班、西園班）、病態の確認と、マウスモデルを用いた遺伝子治療の実証的な検証を行った（魚崎班、小板橋班）。

【iPS 細胞由来心筋細胞を用いた病態モデル開発】

iPS 細胞由来心筋細胞を用いた解析では、indel 変異を導入する Truncation モデルおよび心筋症で報告されているミスセンス変異を発現させる強制発現モデルの2種類で、モデルで得られる病態の検証と遺伝子治療や薬物治療の有効性評価を行った。

Truncation モデルでは、2 遺伝子についてそれぞれ未分化 iPS 細胞に対し indel 変異を導入した。その後、未分化 iPS 細胞を心筋細胞へと分化誘導し、細胞形態や生理学的な機能解析を行った。まず、心筋細胞へと分化誘導後にこれら遺伝子が発現しないこと（あるいは Truncation により短縮すること）を確認した。その後、免疫染色により、心筋細胞の形態評価を行った。Truncation により肥大型心筋症となる遺伝子の indel 変異では心筋細胞が大型化（肥大）した。一方、拡張型心筋症となる遺伝子では明らかな肥大は認めなかった。本研

究の開始時点では独自に開発したサルコメアタンパク(alpha-actinin)を蛍光タンパクで標識し、高速にイメージングを行う Sarcomere Shortening を用いていたが(Ahmed, J Vis Exp, 2021)、これはスループット性が低かった。そこで、より多くの遺伝子変異解析を実現するため、Cytomotion (IonOptics 社)を導入し、位相差顕微鏡での高速ライブイメージングより、収縮弛緩プロファイルを得た。肥大型心筋症、拡張型心筋症ともに収縮能が減少した。また、収縮時間や弛緩時間の延長など、収縮弛緩プロファイル全体に影響が見られることが明らかとなった。

ミスセンス変異の解析では、心筋症で報告されている 5 遺伝子 18 種類の変異に関して、同様に解析を行った。これらの遺伝子変異は拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、緻密化障害と幅広い病態で同定されたサルコメア遺伝子あるいは核膜遺伝子の変異である。これらのミスセンス変異を発現した iPS 細胞由来心筋細胞では、共通して心筋細胞の肥大が観察された。さらに、筋原線維の破綻、菲薄化、配向異常（サルコメアディスプレイ）などが観察され、収縮能ないし弛緩能の低下が観察された。これらの遺伝子変異が直接的ないし間接的に筋原線維の形成、維持に重要な役割を示唆しており、心筋症の病態を説明するものであると考えられた。

以上の結果は我々の新しい手法で簡便かつ素早く心筋症で同定された遺伝子変異がどのような影響を与えるのかを評価できる有用な病態モデルであることを示している。また、本研究では得られたデータは更にトランスクリプトーム、画像解析、機械学習などに応用し、遺伝子変異から直接その病態を推定するようなモデルへと発展させたい。

【心筋症モデルマウス】

続いてこの病態モデルが治療効果の評価に有用であるかを検証した。まず 2 遺伝子変異について遺伝子治療の有効性評価を行った。いずれの場合であっても収縮能や弛緩能といった機能面での改善が見られ、これらの遺伝子変異に対し遺伝子治療が有効であると期待される結果を得た。また、薬物投与が有効であるかを検証する目的で弛緩能が低下するモデルに対し、肥大型心筋症に対し期待されている薬剤を投与したところ、弛緩能が改善し、薬物の治療効果評価への応用が期待されることが明らかになった。

iPS 細胞由来心筋細胞を用いた病態モデルと治療効果の予測が生体内の結果と一致するかについて検討を行うため、幅広い心筋症をカバーする心筋症マウスリソースの確立を行った。具体的には、研究開始時点ですでに作出済みであった 3 種類のマウス系統に加え、新たに心筋症で報告されている 8 種類の点変異を有する新しいマウスモデルを作出した。これらの 11 種類の点変異は肥大型心筋症、拡張型心筋症、拘束型心筋症、左室緻密化障害、ミトコンドリア心筋症の 5 病型のいずれかで同定されたものである。これらのマウス系統作出では、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集を用いたが、点変異導入においてヘテロマウスよりもホモマウスがしやすいという問題点が見られ、心筋症モデルマウス確立の障壁となった。そこで、ヘテロマウスを簡便に作出するための手法開発も行った。

11 系統中 9 系統で何らかの病態を確認し、1 系統については病態を検証中であるが他の報告と比較すると今後心機能が低下することが期待できる。6 系統では生後比較的早期からホモマウスで心機能の低下が見られ、4 系統は生後 2 週程度で死亡する。また、これらのうち 1 系統はヘテロマウスでも成体で拡張能低下を主体とした心機能の低下が認められることを見出した。比較的心機能が保たれている 2 系統は加齢に伴う収縮能の低下や、圧負荷・薬物負荷などを加えることで、心機能の低下が観察され、心筋症に伴う心不全のモデルとして有用である。さらに 1 系統はヘテロメスマウスが出産は可能であるが、その後の哺乳に問題があり、産後に全産仔が死亡してしまうという予想外の病態が観察された。今後仮親を用いてホモマウスの生育と病態評価を予定

している。病態が確認された遺伝子変異のうち1つは、本学で経験した症例に基づくものであり、その変異は報告されていない新規のものである。また、異なる1つは他大学で経験した症例であるが、既存の報告（肥大型心筋症）とは異なる病態（左室緻密化障害）から同定されたものである。いずれも経験症例に類似した病態が確認された。なぜこうした遺伝子変異が病態を来すのかを理解するうえで欠かせないモデルとなる。

多くの心筋症は顕性遺伝であり、ヘテロ変異であっても発症する。一方、本研究で作出したマウス系統の大半はホモでのみ発症する。こうしたヒトとマウスの違いは多数報告されており、動物モデルの限界である。しかし、患者では発症してから受診するため、その病態がどのように進展するかを明らかにするのは困難である。疾患 iPS 細胞に対する期待もあるが、他の細胞との相互作用や分化細胞の未熟性など、病態再現は不十分である。動物モデルは遺伝学的な限界はあるが、病態を再現でき、さらにその進展を経時的に追跡できる点など、メリットも多い。本研究で多くの病態モデルを作出した。これらは遺伝子治療の研究だけでなく、心筋症の病態理解と今後の治療法開発において重要な役割を果たすと期待している。

【遺伝子治療の検討】

開発・検証した病態モデルマウスを用いて、遺伝子治療の有効性評価を行った。本研究を通じ、Mybpc3 変異マウスを3系統作出したが、そのうち2系統は肥大型心筋症を呈する。特に1系統は生後早期から心機能の低下が著名であるが、少なくとも1歳程度まで生存する。一方、もう1系統は加齢に伴い徐々に心機能が低下する。こうした病態が異なるモデルに対して、同一の遺伝子治療用ベクターを投与することで、遺伝子治療を行うために必要な患者背景（病態）に関する知見を得ることができる。まずより重症度の高いモデル（non-sense 変異）に対し、AAV を用いて、心筋細胞特異的に Mybpc3 を発現させた。生後3-4ヶ月に AAV を投与し、1ヶ月後に心機能評価を行ったところ全く心機能の改善は見られなかった。その後、発現量を確認したが、ヘテロマウスと同程度の発現であった。続いて8週齢の軽症モデル（mis-sense 変異）に対し AAV を投与し、8週間のフォローアップを行った。AAV 未投与群は観察期間中、徐々に心機能が低下していった。一方で AAV により遺伝子治療を行った群では、心機能の低下はなく、治療効果が見られた。これらの結果から、遺伝子治療は心機能の低下やリモデリングが起こるよりも早いタイミングで治療を行う必要があると考えられる。

現在解析中の系統も含め、今後より多くの病態モデルを用い、病態の進行経過の様々なタイミングで遺伝子治療を行い、治療効果を明らかにしていくことが必要である。現在、様々な遺伝子変異に対する遺伝子治療開発が世界中で進められている。本研究と今後の展開は、こうした遺伝子治療開発に対し、どういった患者（あるいは遺伝子変異）に対し、どういったタイミングで介入するべきか、という知見をもたらすものと考えられる。

Project Summary:

Our endeavor focuses on advancing gene therapy for cardiomyopathy, specifically addressing the challenges posed by missense mutations, which is unknown if gene therapy is effective.

The primary objective of our study is to establish robust in vitro models for assessing the efficacy of gene therapy in cardiomyopathy. To achieve this, we have developed novel pathological models utilizing iPSC cell-derived cardiomyocytes. We took two different approaches for truncation (nonsense) and missense mutations. For truncation mutations, we made indel mutations in iPSCs and differentiated them into cardiomyocytes. We observed significant hypertrophy in cardiomyocytes, mirroring the pathological features of hypertrophic cardiomyopathy. The cardiomyocytes with indel mutations displayed a reduction in contraction and an increase in relaxation. Taken together, this model faithfully recapitulates the genetic mutations observed in cardiomyopathy patients. For missense mutations, we developed a method to express target mutations in iPSC-derived cardiomyocytes and demonstrated that missense mutations led to either myofibrillar disruption, hypertrophy, reduced contractility, or delayed relaxation, highlighting their role in disease pathogenesis. We also demonstrated that these models are useful in gene therapy and small molecule examination in vitro.

Furthermore, we have expanded our investigation to include a diverse array of mouse models representing various cardiomyopathies. By utilizing CRISPR/Cas9 genome editing, we successfully generated mouse strains harboring specific point mutations implicated in cardiomyopathy. Our efforts have yielded valuable insights into the pathological progression of cardiac dysfunction in these models.

We have conducted evaluations of gene therapy efficacy using our pathological mouse models. By administering gene therapy vectors targeting key mutations, we have observed significant prevention of cardiac dysfunction, particularly when the vectors were administered before the models developed severe pathologies, suggesting that early intervention would be a key for successful gene therapy. These results have profound implications for the development of precision therapies tailored to individual patients based on their genetic profiles.

In conclusion, our comprehensive approach to advancing gene therapy for cardiomyopathy encompasses the development of innovative in vitro models, the characterization of pathological mouse models, and the evaluation of gene therapy efficacy. Through interdisciplinary collaboration and cutting-edge technologies, we aim to revolutionize the treatment landscape for cardiomyopathy and pave the way for personalized therapies tailored to individual patients' genetic profiles.