

日本医療研究開発機構
再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム
再生・細胞医療・遺伝子治療研究開発課題（基礎応用研究課題）
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 心筋細胞を標的とした遺伝子治療・変異修復治療による心臓疾患治療法の開発
(英語) Development of novel therapeutic approaches for cardiac diseases by using gene therapy and variant repair therapy

研究開発実施期間: 令和 4 年 7 月 25 日～令和 7 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 野村 征太郎
(英語) Seitaro Nomura

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人東京大学 医学部附属病院 先端循環器医科学講座 特任准教授
(英語) Department of Frontier Cardiovascular Science, The University of Tokyo

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

和文:

心不全や心筋梗塞といった心臓疾患は多くの細胞が絡む複雑な病態を呈しているため、マウス・ヒトで共通する分子機序を解明することが困難であった。特に、希少なヒト臨床検体から細胞レベルの分子病態を解析する技術が存在しなかった。さらに、病態を制御する可能性のある標的分子が同定されても、標的細胞において選択的に標的分子の機能を制御する技術が存在しなかった。また、重篤な心臓疾患の多くは遺伝性発症であるが、その遺伝子変異を高い精度で編集できる治療法が存在しなかった。つまり、(1) 分子機序の理解 (2) 標的細胞へのデリバリー (3) 変異編集の精度、という点で技術的な問題があった。

これに対して我々は、マウス・ヒトにおける心臓シングルセル解析技術を世界で初めて確立し、DNA 損傷陽性不全心筋を発見し (Nomura et al. Nat Commun. 2018)、致死性不整脈を誘導するドパミン D1 受容体陽性心筋を発見し (Nomura et al. Nat Commun. 2020)、心臓の線維化・心機能低下を抑制する遺伝子 HTRA3 を同定してきた (Nomura et al. Nat Commun. 2022)。高効率で心筋細胞に遺伝子を導入可能な技術を樹立して心筋細胞を標的とする遺伝子治療の基盤を構築した。また、既存の塩基編集技術よりオフターゲット効果が少なく、かつ高効率な塩基編集を可能にする技術を確立してきた。

そこで本研究では、以下の3つの課題に取り組み、心筋細胞を標的とした遺伝子治療・変異修復治療による心臓疾患治療法の開発を目指した。

1. 心不全に対する遺伝子治療開発
2. 心筋梗塞に対する遺伝子治療
3. 遺伝性心血管疾患に対する塩基編集治療法の開発

1. 心不全に対する遺伝子治療開発

まず我々は心臓シングルセル RNA-seq 解析および細胞間相互作用の解析から、心筋細胞と線維芽細胞の間の TGF- β を介した相互作用が心不全形成に寄与することを解明した。心筋細胞において TGF- β が活性化することによって NOX4 活性化および DNA 修復酵素機能低下が生じ、DNA 損傷が蓄積して p53 が活性化する。その結果、老化関連分泌形質への変換が促されて IGFBP7 などの炎症性因子を分泌するようになって心不全が増悪する。さらに我々は、心筋で TGF- β に直接結合して分解する HTRA3 を同定し、そこに遺伝学的に介入することによって TGF- β を制御し、心筋細胞の健常化を誘導できることを見出した (Ko, Nomura et al. Nature Commun. 2022)。さらに IGFBP7 が老化血管内皮細胞からも分泌されることを明らかにし、これを遺伝学的・免疫学的に抑制すると心不全の治療ができることを解明した (Katoh, Nomura et al. Circulation 2024)。

さらに我々は、心筋細胞における DNA 損傷が心不全病態をどの程度規定しているかを明らかにして臨床応用への道筋をつけるため、心不全患者の心臓組織検体における DNA 損傷の程度とその後の臨床像の関係性を調べた。その結果、様々な病態で誘導される心不全（拡張型心筋症・抗がん剤誘発性心不全・高血圧性心不全・サルコイドーシス・心筋炎など）において共通して、心筋細胞における DNA 損傷の程度とその患者の薬剤応答性の間には逆相関が認められた。すなわち、心筋 DNA 損傷の程度が強ければ強いほど、薬剤治療によって心臓機能が回復する可能性は低くなるということである。また、DNA 損傷の程度を評価して 5.99% を閾値として層別化すると、感度・特異度ともに 80% 程度の高い精度で心不全患者の臨床的予後を類推できることも判明した (Dai, Nomura et al. JACC Heart Failure. 2023)。また心筋 DNA 損傷とゲノム変異の関係性を解析したところ、拡張型心筋症において非サルコメア遺伝子変異症例で心筋 DNA 損傷が有意に蓄積しており、治療応答性が不良であることが明らかとなった (Dai, Nomura et al. Circ Heart Fail. 2024)。

2. 心筋梗塞に対する遺伝子治療

心筋梗塞の病態を理解して心筋細胞に介入する遺伝子治療法の開発を目指した。まずシングルセル RNA-seq および空間オミックス解析によって梗塞巣の心筋細胞が分泌する IGFBP7 遺伝子を発見した。そして近傍の心臓線維芽細胞から分泌される TGF- β を分解する HTRA3 遺伝子を発見し、HTRA3 遺伝子に介入することで、心筋梗塞病態を治療できることを解明した (Ko, Nomura et al. Nature Commun. 2022)。また心筋梗塞後の心臓リモデリングの時空間的な変化を明らかにするために空間オミックス解析を実施し、梗塞境界部における CSRP3 遺伝子を発見し、これに対する遺伝子治療によって病的な心臓リモデリングを治療できることを解明した (Yamada, Nomura et al. Nature Cardiovasc Res. 2023)。

3. 遺伝性心血管疾患に対する塩基編集治療法の開発

遺伝性心血管疾患（肥大型心筋症・拡張型心筋症・先天性心疾患）の多くは1塩基変異で発症するが、それを高い精度で修復する技術が存在せずには有効な治療法が開発されてこなかった。そこで本研究では、一塩基変異を高精度で修復する prime editing 技術を in vivo で実施可能にし、高精度塩基編集によるゲノム編集治療法を確立することを目指した。その結果、Nkx2.5 遺伝子変異によって生じる先天性心疾患（心房中隔欠損症）モデルマウスにおいて狙った一塩基変異を修復する in vivo prime editing 治療法を開発し、実際に心房中隔欠損症を治療することに成功した (Ko T, Nomura S, et al. Circulation Genom Precis Med.

さらに、本治療法の対象となる心不全の一塩基変異によるレアバリエーション解析を全ゲノムシーケンスデータに基づいて深めた。まず、遺伝的に心不全を発症する拡張型心筋症患者において、germline mutation 以外に、クローン性造血の関与について検討した。その結果、拡張型心筋症ではクローン性造血の頻度が高いこと、さらにクローン性造血が存在すると germline mutation とは独立して心不全の治療応答性を増悪することを明らかにした (Inoue, Nomura et al. JACC Basic Transl Sci. 2024)。さらにこれまで原因不明であった心不全の病態にコピー数変異や構造変異が存在することを解明し、ロングリードシーケンス解析によってバリデーションした。また肥大型心筋症において、複数のサルコメア遺伝子変異や心血管関連遺伝子変異の合併によって、肥大相から拡張相 (心不全) へと移行する表現型を呈することを解明した (Hiruma, Nomura et al. JACC Heart Failure 2024)。重症心不全を呈する BAG5 遺伝子複合ヘテロ変異 (Inoue, Nomura et al. Circulation GPM 2023)・LAMP2 遺伝子 (Abe, Komuro et al. Circ J 2024)・PRKAG2 遺伝子 (Hiruma, Nomura et al. Circulation Heart Failure 2024)・FLNC 遺伝子 (Nakayama, Nomura et al. ESC Heart Fail. 2025) の新規変異による肥大型心筋症を発見し、肥大型心筋症の国際 gene curation expert panel によって、これらの遺伝子が肥大型心筋症における definite な causal gene であることが示された (Hespe et al. J Am Coll Cardiol. 2025)。

英文：

Heart diseases such as heart failure and myocardial infarction present complex pathologies involving numerous cell types, making it difficult to elucidate common molecular mechanisms between mice and humans. In particular, there was no technology available to analyze cellular-level molecular pathologies from rare human clinical samples. Furthermore, even when potential target molecules for controlling the pathology were identified, there was no technology to selectively control the function of these target molecules in specific target cells. Additionally, many severe heart diseases are hereditary, but there were no therapeutic methods capable of precisely editing these genetic mutations. In essence, there were technical challenges in terms of (1) understanding molecular mechanisms, (2) targeted delivery to specific cells, and (3) precision of mutation editing.

In response to these challenges, we have established, for the first time globally, cardiac single-cell analysis technology in both mice and humans. Using this, we discovered DNA damage-positive failing cardiomyocytes (Nomura et al. Nat Commun. 2018), identified dopamine D1 receptor-positive cardiomyocytes that induce lethal arrhythmias (Nomura et al. Nat Commun. 2020), and identified the HTRA3 gene, which suppresses cardiac fibrosis and dysfunction (Nomura et al. Nat Commun. 2022). We have also established a highly efficient gene delivery technology for cardiomyocytes, thereby building a foundation for gene therapy targeting cardiomyocytes. Furthermore, we have developed a technology for high-precision base editing that has fewer off-target effects than existing base editing technologies.

Therefore, in this study, we addressed the following three aims, aspiring to develop treatments for heart diseases through cardiomyocyte-targeted gene therapy and mutation repair therapy:

1. Development of gene therapy for heart failure
2. Gene therapy for myocardial infarction

3. Development of base editing therapy for inherited cardiovascular diseases

1. Development of Gene Therapy for Heart Failure

First, through cardiac single-cell RNA-seq analysis and cell-cell interaction analysis, we elucidated that TGF- β -mediated interaction between cardiomyocytes and fibroblasts contributes to heart failure formation. In cardiomyocytes, TGF- β activation leads to NOX4 activation and impaired DNA repair enzyme function, resulting in DNA damage accumulation and p53 activation. Consequently, cells convert to a senescence-associated secretory phenotype, secreting inflammatory factors such as IGFBP7, which exacerbates heart failure. Furthermore, we identified HTRA3, which directly binds to and degrades TGF- β in the myocardium, and found that genetic intervention targeting HTRA3 can control TGF- β and induce the normalization of cardiomyocytes (Ko, Nomura et al. *Nature Commun.* 2022). Furthermore, we clarified that IGFBP7 is also secreted from senescent endothelial cells, and found that its genetic and immunological inhibition can treat heart failure (Kato, Nomura et al. *Circulation* 2024). To further clarify the extent to which DNA damage in cardiomyocytes dictates heart failure pathology and to pave the way for clinical application, we investigated the relationship between the degree of DNA damage in cardiac tissue samples from heart failure patients and their subsequent clinical outcomes. As a result, we found a common inverse correlation between the extent of DNA damage in cardiomyocytes and the patients' drug responsiveness across various heart failure etiologies (e.g., dilated cardiomyopathy, anti-cancer drug-induced heart failure, hypertensive heart failure, sarcoidosis, myocarditis). This means that the more severe the myocardial DNA damage, the lower the likelihood of cardiac function recovery through drug treatment. Furthermore, by stratifying patients based on a DNA damage threshold of 5.99%, we found that the clinical prognosis of heart failure patients could be predicted with high accuracy (approximately 80% sensitivity and specificity) (Dai, Komuro et al. *JACC Heart Failure.* 2023). Analyzing the relationship between myocardial DNA damage and genomic mutations, we revealed that in dilated cardiomyopathy, non-sarcomere gene mutation cases showed significant accumulation of myocardial DNA damage and poor treatment responsiveness (Dai, Komuro et al. *Circ Heart Fail.* 2024).

2. Gene Therapy for Myocardial Infarction

We aimed to develop gene therapy methods that intervene in cardiomyocytes by understanding the pathology of myocardial infarction. First, through single-cell RNA-seq and spatial omics analysis, we discovered the IGFBP7 gene secreted by cardiomyocytes in the infarct area. We then identified the HTRA3 gene, which degrades TGF- β secreted by neighboring cardiac fibroblasts, and elucidated that intervention targeting the HTRA3 gene can treat myocardial infarction pathology (Ko, Nomura et al. *Nature Commun.* 2022). Additionally, to elucidate the spatiotemporal changes in cardiac remodeling after myocardial infarction, we performed spatial omics analysis and discovered the CSRP3 gene in the infarct border zone. We elucidated that gene therapy targeting CSRP3 can treat pathological cardiac remodeling (Yamada, Nomura et al. *Nature Cardiovasc Res.* 2023).

3. Development of Base Editing Therapy for Inherited Cardiovascular Diseases

Many inherited cardiovascular diseases (hypertrophic cardiomyopathy, dilated cardiomyopathy, congenital heart disease) are caused by single-nucleotide variants, but effective treatments have not been developed due to the lack of high-precision repair technologies. Therefore, in this study, we aimed to establish high-precision base editing therapy by enabling *in vivo* prime editing technology to precisely repair single-nucleotide variants. As a result, we developed an *in vivo* prime editing therapy that repairs targeted single-nucleotide variants in a mouse model of congenital heart disease (atrial septal defect) caused by an Nkx2.5 gene mutation, successfully treating atrial septal defect (Ko T, Nomura S, et al. Circulation Genom Precis Med. 2025 Jun 9:e005194. doi: 10.1161/CIRCGEN.124.005194.).

Furthermore, we deepened the rare variant analysis of single-nucleotide variants causing heart failure, which are targets for this therapy, based on whole-genome sequencing data. First, in patients with genetically inherited dilated cardiomyopathy, we investigated the involvement of clonal hematopoiesis in addition to germline mutations. As a result, we revealed that the frequency of clonal hematopoiesis is high in dilated cardiomyopathy, and furthermore, that the presence of clonal hematopoiesis exacerbates heart failure treatment responsiveness independently of germline mutations (Inoue, Komuro et al. JACC Basic Transl Sci. 2024). We also elucidated the presence of copy number variations and structural variations in previously unexplained heart failure pathologies and validated them using long-read sequencing analysis. In hypertrophic cardiomyopathy, we clarified that the combination of multiple sarcomere gene mutations and cardiovascular-related gene mutations leads to a phenotype transition from the hypertrophic phase to the dilated phase (heart failure) (Hiruma, Komuro et al. JACC Heart Failure 2024). We discovered novel mutations in the BAG5 gene (compound heterozygous mutations) (Inoue, Komuro et al. Circulation GPM 2023), LAMP2 gene (Abe, Komuro et al. Circ J 2024), PRKAG2 gene (Hiruma, Komuro et al. Circulation Heart Failure 2024), and FLNC gene (Nakayama, Nomura et al. ESC Heart Fail. 2025) causing severe heart failure, and these genes were identified as definite causal genes in hypertrophic cardiomyopathy by an international gene curation expert panel for hypertrophic cardiomyopathy (Hespe et al. J Am Coll Cardiol. 2025).