

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名： ゲノム解析技術および疾患特異的 iPS 細胞を用いた心筋症に対する革新的な医薬品開発研究
2. 研究開発代表者： 国立大学法人東京大学・医学部附属病院・教授 小室一成
3. 研究開発の成果

本研究の目的は、心筋症患者のゲノム解析および心筋症患者由来 iPS 細胞を分化誘導した心筋細胞の解析を通して、心筋症患者のゲノム異常および心筋細胞異常を明らかにするとともに、心筋症 iPS 由来心筋細胞を用いたスクリーニング系を確立し、製薬企業と共同で新たな心筋症治療薬を開発することである。

我々は、心筋症を含む遺伝性心血管疾患の発症に寄与すると報告されている 95 遺伝子のエクソン領域だけをシークエンスする手法を開発し、効率良く標的遺伝子の変異を同定している。これまで心筋症患者 51 例（発症者 44 名、非発症者 7 名）に対して遺伝子解析を行った結果、拡張型心筋症 23 例において TTN 遺伝子（7 例）、LMNA 遺伝子（2 例）、BAG3 遺伝子（3 例）に、肥大型心筋症 16 例において MYBPC3 遺伝子（12 例）に疾患発症に寄与すると考えられる変異を同定した。つまり両疾患ともに半数以上の発症者において原因と考えられる遺伝子異常を同定している。また拡張型心筋症では既に報告のある BAG3 遺伝子の変異を左室緻密化障害患者において同定（変異部位は異なる）し、変異部位が発症疾患を決定している可能性を見出した。さらに発症原因となる遺伝子変異を同定できていない患者に対してエクソーム解析を行うことで、DNA 障害時に活性化する遺伝子に新規の心筋症原因変異を同定した。

同定した遺伝子変異の機能を理解するため、iPS 細胞由来心筋細胞の疾患特異性を解析している。現在までに、健常者 2 名、肥大型心筋症患者 3 名、拡張型心筋症患者 5 名から樹立した iPS 細胞を心筋細胞へと分化誘導し、遺伝子発現、形態、生理機能の解析を通して心筋症特有の疾患特異的表現型を探索するとともに、疾患特異的表現型を指標としたスクリーニング系を構築し、化合物ライブラリーのスクリーニングをおこなった。まず遺伝子発現変化に関しては、リアルタイム PCR を用いた解析の結果、肥大型心筋症では心肥大に伴って発現が変化することが知られている遺伝子、拡張型心筋症では心不全に伴って発現が変化することが知られている遺伝子の発現に変化を認めた。

ハイコンテツイメーシングシステムを用いて、疾患特異的に発現が変化する遺伝子のタンパクレベルでの発現やサルコメアの形成、ギャップジャンクションの形成、核の形態、ミトコンドリアの形態など、疾患特異的な特徴を掴むことができた。そして肥大型心筋症 iPS 細胞由来心筋細胞の形態的特徴を指標とした治療薬スクリーニング系で 5,120 化合物のスクリーニングをおこなうとともに、ヒット化合物を絞り込むための高次機能評価系を構築した。拡張型心筋症および重症心不全患者の心臓で発現が低下することが報告されているタンパクの発現が拡張型心筋症 iPS 細胞由来心筋細胞でも低下していることに着目し、当該タンパクの発現を回復させるような薬剤をスクリーニングするハイコンテツスクリーニング系を構築し、市販化合物 1,029 化合物のスクリーニングをおこなった。

またカルシウム感受性色素の染色による生理機能解析を行ったところ、肥大型心筋症および拡張型心筋症患者 iPS 細胞由来心筋細胞で共通する異常が存在すること、迅速ペーシングやイソプロテレノール添加などの負荷を加えることでその異常が増幅されることを見出した。さらに、市販薬のスクリーニングを通して肥大型心筋症 iPS 細胞由来心筋細胞で認めるカルシウムトランジェントの異常を用量依存的に改善させる薬剤を 1 つ同定した。

現在、ゲノム解析で同定された遺伝子変異ごとに、iPS 細胞の表現型がどのように異なるか解析しており、これによって遺伝子変異がどのように細胞表現型の異常につながるかを明らかにできると考えている。