

氏 名	安 済 達 也
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 651 号
学位授与年月日	令和 4 年 3 月 23 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	ヒト心筋細胞の成熟度評価方法の確立と拘束型心筋症の病態解明
論文審査委員	(委員長) 教授 今 井 靖
	(委 員) 教授 水 上 浩 明 教授 新 保 昌 久

論文内容の要旨

1 研究目的

今回、自治医科大学附属病院小児科で拘束型心筋症（Restrictive cardiomyopathy: RCM）の双胎乳児症例を経験した。いずれの症例も入院 2 週間後に死亡した。RCM は心室の拡張障害を特徴とする心筋症で、発症機序は解明されておらず、心臓移植以外に有効な治療法はない。この患者の原因遺伝子検索を行うとともに、RCM の病態解明、その証明に必要な心筋細胞成熟機序の探索、新規治療法の開発を目指した。

2 研究方法

RCM 家系の原因遺伝子検索

全エクソーム解析を行い、RCM の原因遺伝子検索を行った。

ヒトとマウスで共通して使用できる新規成熟マーカー遺伝子の同定

多能性幹細胞由来心筋細胞（Pluripotent stem cell derived cardiomyocytes: PSC-CMs）は、疾患モデリングツールとして期待されるが、一般的に PSC-CMs は胎児期相当までしか成熟せず、生後に発症するような疾患の病態を再現できない可能性がある。これまでに、PSC-CMs を成熟させる様々な試みが行われてきたが、そもそも PSC-CMs の成熟度を評価する方法は確立されていない。成熟マーカー遺伝子は、胎児期から成体にかけて発現が上昇する遺伝子で、PSC-CMs の成熟度を評価する一つの指標であるが、ヒトの成熟マーカー遺伝子は十分に検証されておらず、マウスの成熟マーカー遺伝子で代用されてきた。今回、過去に報告されたトランスクリプトームデータセットのうち、マウスとヒトの心臓に関するデータセットを再解析することで、ヒトとマウスで用いることができる新たな成熟マーカー遺伝子を同定した。

新規成熟マーカー遺伝子の有用性の検証

同定した新規成熟マーカー遺伝子の内、*CKM* と *CKMT2* について、成熟レポーター細胞を作成した。それぞれの遺伝子座に蛍光タンパクである enhanced green fluorescent protein (EGFP) をノックインしたヒト iPS 細胞を作成し、心筋細胞へ分化誘導させた。Flow cytometry で EGFP 陽性細胞の細胞数や輝度を解析した。

点変異マウス作出と表現型解析

CRISPR-Cas9 によるゲノム編集技術を用いて、RCM 患者から同定した新規遺伝子変異に相当する点変異を有するマウスを作出した。

マウス ES 細胞由来心筋細胞とアデノ随伴ウイルスベクターを用いた疾患モデリング

今回経験した RCM 患者は、乳児期発症であり、未熟な PSC-CMs であっても病態が再現できると考えた。In vitro でサルコメア機能解析を行うため、共同研究を行う再生医学研究部で開発された、Myom2 の遺伝子座に red fluorescent protein (RFP) をノックインしたマウス ES 細胞 (Myom2-RFP) を心筋細胞へ分化誘導し (Myom2-RFP 心筋細胞)、アデノ随伴ウイルス (adeno associated virus: AAV) ベクターで新規遺伝子変異を導入することで、新たな疾患モデリングを行った。

3 研究成果

新規遺伝子変異同定

RCM 双胎乳児症例から *Troponin I 3* (*TNNI3*) の新規遺伝子変異を同定した。

新規成熟マーカー遺伝子同定

ヒトとマウスで共通して用いることができる 12 個の新規成熟マーカー遺伝子 (*MB*, *COX7A1*, *CKMT2*, *CASQ2*, *CKM*, *FABP3*, *HRC*, *HSPB6*, *COX6A2*, *TCAP*, *S100A1*, *MGP*) を同定した。また、従来用いられてきた成熟マーカー遺伝子によるヒト PSC-CMs の成熟度評価では不十分であること、これまでに報告された PSC-CMs の成熟化実験が必ずしも成体レベルまでの成熟にはなっていないことが示された。

CKM と *CKMT2* の成熟レポーター細胞

成熟レポーター細胞を心筋細胞へ分化誘導し、1 ヶ月培養したところ、低頻度ながら EGFP の発現を確認できた。また、共同研究を行う再生医学研究部で現在開発中の PSC-CMs を成熟させる条件下で培養することで、EGFP の発現細胞数、輝度ともに増加した。EGFP の発現から、成熟マーカー遺伝子が発現していることを確認できた。

点変異マウスの作出と表現型解析

Tnni3 変異ホモマウスは生後 10 日以内に死亡した。CRISPR-Cas9 を用いたことにより、非相同性末端結合が起こることでフレームシフトやナンセンス変異を有するマウスも作出されたが、中でも目的の変異箇所の次のアミノ酸がナンセンス変異となった、*Tnni3* ナンセンスホモマウスは、*Tnni3* 変異ホモマウスと同様の経過で死亡した。今回の解析では *Tnni3* 変異ヘテロマウスは得られておらず、出生した *Tnni3* 変異ホモマウスは全例死亡したため、詳細な表現型解析はできなかった。

Myom2-RFP 心筋細胞と AAV ベクターを用いた疾患モデリング

Myom2-RFP 心筋細胞に変異 *Tnni3* を強制発現させることで、サルコメアの弛緩障害が生じた。また、変異 *Tnni3* に加えて野生型 *Tnni3* も同時に発現させる遺伝子治療実験を行ったところ、サルコメア弛緩障害が改善することがわかった。

4 考察

今回同定した新規成熟マーカー遺伝子を用いることで、より正確な成熟度評価が可能になると考えた。正確な成熟度評価方法を基礎に、新たな PSC-CMs の成熟法開発につながると考えた。

Tnni3 変異ホモマウスは生後 10 日以内に死亡することがわかった。また、偶然作出された *Tnni3* ナンセンスホモマウスと同様の経過で死亡したことから、今回同定した新規 *Tnni3* 変異は *Tnni3* の機能喪失と同じ表現型であることが示唆された。*Tnni3* 変異ホモマウスは生後早期に死亡し、詳細な表現型解析ができないため、ヘテロマウス作出が今後の課題である。

AAV ベクターは、遺伝子治療を行うベクターとしてすでに臨床応用されているが、疾患モデリングの手法として用いるのは新たな試みである。RCM の表現型であるサルコメアの弛緩障害を再現することができたことから、この新たな疾患モデリングの有用性が示唆された。また、マウス実験の結果から、*in vitro* で遺伝子治療実験を行ったところ、変異 *Tnni3* に加えて野生型 *Tnni3* も同時に発現させることで、変異 *Tnni3* によって生じたサルコメア弛緩障害が改善することがわかった。この結果から、*TNNI3* 遺伝子変異によるサルコメア機能障害に対する遺伝子治療の可能性が示唆された。

5 結論

RCM 患者から同定した新規 *TNNI3* 変異の機能解析を進めていく中で、まずはヒトやマウスの PSC-CMs の成熟度を評価する方法を検証し、12 個の新規成熟マーカー遺伝子を同定した。今後、検証を進めていくことで、より正確な PSC-CMs 成熟度評価方法の確立、それを元にした新たな成熟法開発につながると考えられた。マウス作出や Myom2-RFP 心筋細胞と AAV ベクターを用いたサルコメア機能解析を通して、今回同定した新規 *TNNI3* 変異が RCM 発症と関連していることが示唆された。また、*In vitro* で遺伝子治療の有効性が示唆され、今後マウスモデルなどによる検証を進めていくことで、将来的には *TNNI3* 変異によって発症する心筋症に対して、遺伝子治療が選択肢の一つとなる可能性がある。

論文審査の結果の要旨

申請者の安済達也氏は自治医科大学附属病院小児科で拘束型心筋症（Restrictive cardiomyopathy: RCM）の双子乳児症例を経験、お二人とも早期に亡くなられたが、それを契機に RCM の病態解明を研究課題として大学院の 4 年間精力的に取り組まれた。その要点は以下の通りである。

- ①RCM 双子乳児症例から Troponin I 3 (TNNI3) の新規遺伝子変異を同定
- ②心筋症の病態解明において心筋細胞の成熟のプロセスを理解することが必要であり、申請者らはヒトとマウスで共通して用いることができる 12 個の新規成熟マーカー遺伝子 (MB, COX7A1, CKMT2, CASQ2, CKM, FABP3, HRC, HSPB6, COX6A2, TCAP, S100A1, MGP) を同定。加えて従来用いられてきた成熟マーカー遺伝子によるヒト PSC-CMs の成熟度評価では不十分、既報の PSC-CMs の成熟化実験が必ずしも成体レベルまでの成熟に至っていない可能性を示した
- ③先述の①の変異を導入した遺伝子改変マウスを CRISPR-Cas9 システムを用いて作成、そのホモ体は生後 10 日以内に死亡。標的部位の次のアミノ酸がナンセンス変異となる個体も得られたが同様の表現型であった。出生早期に死亡するため機能的解析が難しいが、追加実験など新たな検証をすでに予定している。
- ④③のマウスの治療を考慮しアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いての治療可能性を検証している。具

体的には Myom2-RFP 心筋細胞に変異 Tnni3 を強制発現させることでサルコメアの弛緩障害が生じ、そこへ野生型 Tnni3 も同時に発現させる遺伝子治療実験を行うとサルコメア弛緩障害が改善されることが示され、AAV を用いた治療可能性を示した。

臨床現場で経験した症例に端を発して実施された研究であり、新規遺伝子変異を同定、その遺伝子を導入した変異マウスを作成、早期に死亡するため詳細な病態解析が難しく今後のさらなる検討を要するが、この表現型に対する治療可能性を模索し細胞レベルの検討で AAV を用いて治療出来る可能性を示した。まさにベッドサイドから基礎研究（ベンチ）を行ったトランスレーショナルリサーチの模範となる独創性の高い研究であり、かつ難病である心筋症の病態、さらにはその治療の可能性を探索するもので医学的意義は極めて高い（この成果について少なくとも一部は論文投稿準備中である）。また申請者の課題全体に関連して心筋細胞の成熟課程を理解することの意義は大きくその分子マーカーの意義について探求し国際誌に既に報告している。

当初提出された論文について改善点を指摘申し上げたところ適切に加筆修正がなされており、最終判定として医学博士論文として合格と判断する。

最終試験の結果の要旨

申請者の安済達也氏は自治医科大学附属病院小児科で拘束型心筋症（Restrictive cardiomyopathy: RCM）の双胎乳児症例を経験、お二人とも早期に亡くなられたが、それを契機に RCM の病態解明を研究課題として大学院の 4 年間精力的に取り組まれた。その要点は以下の通りである。

- ①RCM 双胎乳児症例から Troponin I 3 (TNNI3) の新規遺伝子変異を同定
- ②心筋症の病態解明において心筋細胞の成熟のプロセスを理解することが必要であり、申請者らはヒトとマウスで共通して用いることができる 12 個の新規成熟マーカー遺伝子 (MB, COX7A1, CKMT2, CASQ2, CKM, FABP3, HRC, HSPB6, COX6A2, TCAP, S100A1, MGP) を同定。加えて従来用いられてきた成熟マーカー遺伝子によるヒト PSC-CMs の成熟度評価では不十分、既報の PSC-CMs の成熟化実験が必ずしも成体レベルまでの成熟に至っていない可能性を示した
- ③先述の①の変異を導入した遺伝子改変マウスを CRISPR-Cas9 システムを用いて作成、そのホモ体は生後 10 日以内に死亡。標的部位の次のアミノ酸がナンセンス変異となる個体も得られたが同様の表現型であった。出生早期に死亡するため機能的解析が難しいが今後さらに検証を予定されている。
- ④③のマウスの治療を考慮しアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いての治療可能性を検証している。具体的には Myom2-RFP 心筋細胞に変異 Tnni3 を強制発現させることでサルコメアの弛緩障害が生じ、そこへ野生型 Tnni3 も同時に発現させる遺伝子治療実験を行うとサルコメア弛緩障害が改善されることが示され、AAV を用いた治療可能性を示した。

上記内容について、明瞭にかつ充実した内容でプレゼンテーションを行い、さらに今後の課題・展望について具体的方向性を示しつつ提示された。また審査委員からの質疑に対して適切に回答しており、小児における循環器疾患およびその病態生理、またそれを明らかにするための分子生物学に関して深い学識を有しておられることが確認された。申請者の研究能力、科学的素養・態度のすべてにおいて医学博士に値すると判定する。