

氏 名	ラザン エルフアードイル アハメド アッバス Razan Elfadil Ahmed Abbas
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	甲第 716 号
学位授与年月日	令和 6 年 3 月 18 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	ミトコンドリア心筋症患者由来 iPS 細胞を用いた病態解明
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教授 中條 浩一 (委 員) 教授 今井 靖 教授 遠藤 仁司 (委 員) 教授 武田 憲彦

論文内容の要旨

1 研究目的

Mitochondrial diseases are severe, often leading to mitochondrial cardiomyopathy (MCM) affecting the heart. Current MCM research faces limitations as it relies on donor fibroblasts instead of cardiomyocytes (CMs). Advances in induced pluripotent stem cell (iPSC) technology offer a unique opportunity to study MCM using patient-specific iPSC-CMs, but challenges in purification and contractile function analysis persist. This study aims to establish MCM-iPSC-CMs disease models with specific goals:

Aim 1: Develop an adeno-associated virus (AAV)-based antibiotic purification method for PSC-CM to address challenges related to time-consuming or mitochondrial-dependent techniques.

Aim 2: Devise AAV-based fluorescent Z-line protein tags for analyzing PSC-CMs' sarcomere function overcoming impracticalities in conventional methods designed for adult CMs' contractility.

Aim 3: Elucidate MCM-iPSC-CMs phenotypes by comprehensively examining changes in cell morphology, sarcomere arrangement, and functional parameters, including contractility, calcium handling, and mitochondrial function.

2 研究方法

1) Mouse ESC (mESC) maintenance and differentiation

SMM18 fluorescence reporter line harboring Myom2-RFP knock-in was used. Cells were maintained in 2i medium. Cardiac differentiation started with the suspension of mPSCs in serum-free differentiation (SFD) medium for two days, and activin-A, BMP4, and VEGF were applied for the next two days. Then, VEGF, bFGF, and FGF10 were used for cardiac lineage induction. From day 7-10 puromycin was introduced to purify CMs.

2) Human PSC (hPSC) maintenance and differentiation

Cells were maintained in AK02N medium with iMatrix-511 and ROCK inhibitor that was removed 24 hours later. For cardiac differentiation, cells were treated with CHIR99021 for two days, followed by Wnt inhibitor treatment for another two days in RPMI+B27-Ins media. From

day 7, cells were maintained in RPMI+B27+Ins.

3) Generation of AAV vectors

For PSC-CM purification, an AAV shuttle vector with cardiac specific promoter driving the blasticidin-resistance gene was constructed. For sarcomere visualization, TCAP, PDLIM3, and CSRP were fused with EGFP under the control of cardiac specific promoter. To produce AAV, HEK293T cells were cultured and transfected with a shuttle vector, pHelper, and pRC6. After five days, the AAV-containing medium was collected and concentrated with an ultra-filtration unit (100,000 MWCO). AAV titer was measured with real-time PCR using ITR primers.

4) Contractility assessment

To assess sarcomere shortening, mPSC-CMs were transduced with AAV expressing Z-line proteins. Live-cell imaging conducted 7 days post-transduction for recording cell contraction.

5) Generation of iPSCs from MCM patients

Fibroblasts from 26 MCM patients and four healthy donors were used to generate iPSCs. SRV-iPSC-1 vector expressing reprogramming factors (OCT4, SOX2, KLF4, and c-MYC) and EGFP was transduced to the fibroblasts to reprogram them to iPSCs.

6) Characterization of PSC-CMs

To assess the efficiency of cardiac differentiation, cells were stained with cell viability marker (LIVE/DEAD staining dye), followed by cardiac troponin T (cTnT) staining. cTnT positive fraction within LIVE cells (dye negative) was examined using flow cytometry. For cell morphology analysis, cells were stained with wheat germ agglutinin (WGA), anti- α -actinin, and anti-TOM20 and imaged with confocal or inverted fluorescence microscopes. To study intracellular calcium transients, cells were loaded with a calcium-sensitive dye, and stimulated by electrical field pulses at 1 Hz. Live-cell imaging was performed using inverted fluorescence microscope. Mitochondrial function was analyzed with Seahorse XF96 extracellular flux analyzer.

3 研究成果

1) Generation of PSC-CMs purification method

I established a novel antibiotics-selection method for purifying PSC-CMs using an AAV6 vector. Traditional methods, such as fluorescence-based sorting or antibiotic selection, were time-consuming or unsuitable due to disrupted mitochondrial function in MCM-iPSC-CMs. The AAV6 method utilized a blasticidin-resistance gene controlled by the cTnT promoter, achieving a high purity of 92% PSC-CMs without negatively impacting viability. This innovative approach addresses the limitations of existing purification methods and provides a reliable technique for disease modeling studies.

2) Establishing a method to assess PSC-CMs sarcomere function in vitro

Assessing sarcomere contractile function in human PSC-CMs is challenging due to their underdeveloped sarcomeres. Existing methods, such as lifeact-GFP and knock-in reporter lines, can be inaccurate or time-consuming. To overcome this, I developed AAV-based sarcomere

protein fluorescent tags, particularly targeting the Z-line. TCAP-GFP, PDLIM3-GFP, and TCAP1-80-GFP successfully localized to the Z-line and worked well for live-imaging. This AAV-based approach presents a tool for efficient and accurate sarcomere function analysis in PSC-CMs without the need for knock-in.

3) MCM disease modeling using iPSC-CMs

MCM-iPSCs were successfully generated from fibroblasts of 23 patients and four healthy donors. Some MCM-iPSC lines exhibited reduced cumulative cell number indicating a link between mitochondrial dysfunction and impaired cell cycle progression. Nevertheless, there was no difference in gene expression regarding pluripotency, differentiation, proliferation, or ROS response. Moreover, cardiac differentiation was comparable in MCM and control lines. Further studies revealed that MCM-iPSC-CMs exhibited hypertrophic morphology and structural abnormalities in sarcomeres and mitochondria. Functionally, MCM-iPSC-CMs had compromised mitochondrial and functions along with abnormal calcium handling. MCM-iPSC-CM phenotypes are similar to those of MCM patients, suggesting MCM disease models were established.

4 考察

MCM, a serious component of mitochondrial disease, significantly raises mortality. iPSC technology now enables disease modeling for understanding pathophysiology and developing treatments. However, lacking suitable PSC-CMs purification and contractility analysis methods pose challenges. Here, I attempted solving these problems. For purification, I devised a robust AAV6-based method, achieving up to 92% purity without relying on functional mitochondria or prolonged processes. For contractility analysis, I introduced AAV6-based fluorescent-tagged sarcomere proteins, like Tcap and Pdlim3, allowing life imaging and sarcomere function analysis. Solving these issues, I established MCM-iPSC lines, revealing reduced cumulative cell numbers. Nonetheless, cardiac differentiation capacities was comparable to control iPSCs. Morphological analysis of MCM-iPSC-CMs highlighted cardiac hypertrophy and sarcomere structural abnormalities, directly linking mitochondrial dysfunction to these phenotypes. Abnormal mitochondrial shape and significantly reduced function underscore the importance of understanding mitochondrial dynamics in MCM. Another significant finding is disturbed calcium handling, critical for cardiac contractile function. Collectively, these findings indicate that MCM-iPSC-CMs reflect MCM pathological features, establishing the first MCM disease model library for investigating pathophysiology and devising treatments.

5 結論

This study creates the first comprehensive library of MCM disease models with iPSCs. It introduces efficient tools for PSC-CM purification and sarcomere function analysis, overcoming previous modeling challenges. MCM-iPSC-CMs recapitulate essential disease

features, advancing our understanding and providing a platform for drug screening and development.

論文審査の結果の要旨

候補者は、ミトコンドリア DNA の変異による心筋症患者の病態を解明することを目的として、26 名患者 (+4 名の健常者) 由来の iPS 細胞からヒト多能性幹細胞由来心筋細胞 (PSC-CM) を樹立し、その分化能、遺伝子発現、形態異常、Ca²⁺動態などの網羅的な解析を目指した。そのためには、患者由来の PSC-CM を、非心筋細胞が混じらない均質なポピュレーションとして集める必要があったが、蛍光リポーター遺伝子の導入や、細胞表面のマーカーを用いるなどの従来の手法では、今回の心筋症モデル細胞を大量に集めるためには不向きであった。

候補者は、まずアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いた遺伝子導入法を導入し、心筋トロポニン(cTNT)プロモーター下に抗生物質のブラストサイジンを発現させることで、分化した細胞を効率よく選択する方法を開発した。さらに収縮能を評価する目的で、サルコメアの Z 線に局在するタンパク質から、Tcap 由来の N 末端 80 アミノ酸に GFP をつなげた Tcap1-80-GFP を作成し、サルコメアを可視化して収縮能を測定するためのシステムを樹立した。

論文の後半部では、上記の方法で樹立、純化した 26 名の患者由来 PSC-CM を用い、それぞれの細胞の増殖能、分化能について、遺伝子発現を指標に解析を行った。またミトコンドリアの異常によって変化する可能性のある ATP レベル、H₂O₂ レベルの測定も行ったが、目立った変化は見られなかった。一方、細胞レベルの肥大、サルコメアやミトコンドリアの形態異常、Ca 動態の異常などについては、いくつかの患者由来 PSC-CM において変化が見られた。

以上より、本学位論文は、患者由来 PSC-CM を効率的に集めるための新たな手法を開発したこと、そしてそれを用いて網羅的な解析を行った点について、高い学問的意義と新規性を有していると評価できる。またミトコンドリア異常による iPS 由来の疾患モデルについても報告は少なく、その点においても高い独創性、新規性を評価できる。

審査員からは細胞肥大(hypertrophy)のクライテリアやミトコンドリア病におけるヘテロプラスミーについて discussion を加えること、グラフのプレゼンテーションや図の説明文を改善するなどの指示があり、それらについては適切に改訂が行われた。

本研究が学位論文として十分な内容であることが、審査員全員により承認された。

最終試験の結果の要旨

候補者からは、まず研究の背景として iPS 細胞を分化させたヒト多能性幹細胞由来心筋細胞 (PSC-CM) の確立手法の歴史についての概説があったのち、本研究の対象であるミトコンドリア異常による心疾患モデルを作成するうえで必要な、心筋のみをできるだけ純度高く集める手法についての説明があった。しかし従来の手法では、時間がかかってしまうなどの問題があり、アデノウイルス随伴ウイルス(AAV)を用いた遺伝子導入により、効率的に患者由来の細胞を樹立し純化する手法の開発を行ったことが説明された。さらに AAV による遺伝子導入により、サルコ

メア Z 線を可視化し、PSC-CM の収縮能を評価する系を立ち上げた。以上の内容は主要論文としてすでに JoVE 誌に掲載済みである。

後半部では 26 名の患者由来 PSC-CM について、その増殖、分化、形態、機能を比較しながら網羅的な解析を行ったことが説明された。増殖、分化に関わる遺伝子発現については目立った変化は見出されなかったが、サルコメア、ミトコンドリアの機能や形態については、いくつかの患者由来 PSC-CM において異常が見られることがわかった。この後半部については、論文としては未発表部分ではあるが、もう 1 報の論文としてまとめるにあたり十分なデータ量と新規性を有していると評価できる。

候補者のプレゼンテーションは非常に明瞭であり、審査員の質疑応答にもよどみなく答えることができおり、医学博士として十分な知識を有していると考えられた。学位論文も上記の通り十分な内容であり、審査員全員が学位にふさわしいと判断した。