

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07064

研究課題名(和文) DMD患者iPS細胞由来の心筋細胞を用いた心不全の病態と治療に関する研究

研究課題名(英文) Research on pathogenesis and development of therapies for cardiac failure using dystrophin-deficient-cardiomyocytes derived from DMD patients

研究代表者

宮崎 大吾 (Miyazaki, Daigo)

信州大学・医学部附属病院・講師(特定雇用)

研究者番号：80596370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：DMD患者より作製したiPS心筋細胞(DMD-iPSC-CMs)に対しエクソンスキップによるジストロフィンタンパク発現回復を誘導すると、DMD-iPSC-CMsで認められるIGF2, TMSB4X発現低下に改善が認められた。続いて、健常者由来iPS心筋細胞を用いてsiRNAによるこれらの遺伝子抑制を行ったところ、IGF2抑制に伴って細胞萎縮が起こりやすく、IGF1発現も抑制されることが確認された。IGF1とIGF2はともにIGF1Rを介しErkシグナル伝達を活性化して心筋壁肥厚へ影響が考えられおり、IGF2発現低下は、DMDの心筋壁の菲薄化に悪影響を与えうる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全はDMDの主な死亡原因となる重要な障害であるが、心不全に関する研究は心筋の採取が難しく十分に進んでいない。DMD患者由来の心筋細胞の作成と網羅的遺伝子解析の結果、さらに健常者由来の心筋細胞に対するsiRNAによる遺伝子発現抑制実験の結果から、DMD患者由来の心筋細胞におけるIGF2発現の低下は、DMD患者の拡張型心筋症の病態を悪化させる可能性が示唆され、学術的意義のみならず心不全治療開発の基礎として社会的意義のある成果と考える。

研究成果の概要(英文)：Heart failure is now becoming the most frequent cause of death in Duchenne muscular dystrophy (DMD); however, the pathomechanisms of cardiomyopathy remain unclear. We generated cardiomyocytes from DMD-specific induced pluripotent stem cells (DMD-iPSC-CMs) donated from a DMD patient, and microarray analysis revealed several proliferation-, regeneration- related genes were down-regulated in DMD-iPSC-CMs. In these genes, IGF2 and TMSB4X gene expressions were recovered along with dystrophin restoration by exon skipping in DMD-iPSC-CMs. Next, we treated iPSC-CMs from healthy person with IGF2 and TMSB4X specific siRNAs. IGF2 knock-down tend to lead decreased size of cardiomyocytes, and led to significant down-regulation of IGF1 in these iPSC-CMs. IGF1 and IGF2 bind IGF1R and activate Erk signal transduction, and are thought to maintain the size of cardiomyocyte and myocardial wall thickness. IGF2 down-regulation might deteriorate the pathology of dilated cardiomyopathy in DMD.

研究分野：筋疾患

キーワード：Duchenne型筋ジストロフィー 心不全 IGF2

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)は進行性の筋萎縮に加えて心筋障害が進行し重症心不全の経過をたどる。DMD 患者の心不全は主な死亡原因として重要であるが、心筋は採取が難しく病態解明や治療開発を行うことが困難であった。この問題に対して我々は DMD 患者から iPSC 細胞(iPSC)を作成、心筋分化誘導を行い、DMD 患者由来の遺伝子変異を保持しジストロフィン欠損した心筋細胞(DMD-iPSC-CMs)を得た。これにより従来困難であった DMD 患者の心筋障害への研究アプローチが可能になった。MD-iPSC-CMs を用いた網羅的遺伝子解析の結果、細胞増殖、細胞分化に関連する遺伝子の有意な減少を見出した。

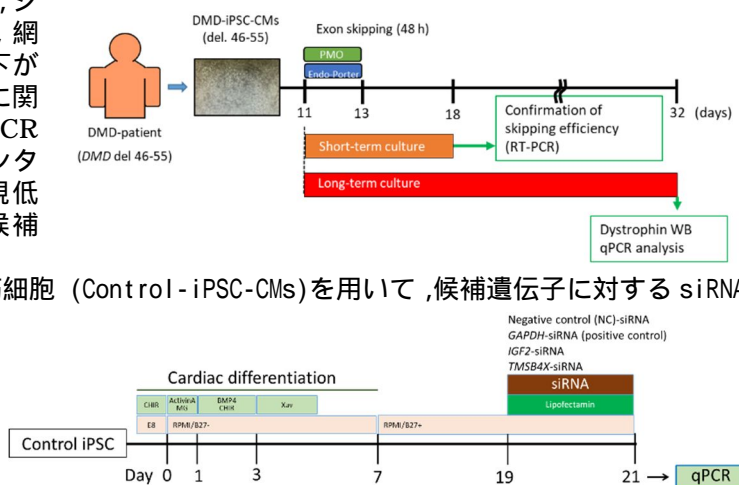
### 2. 研究の目的

DMD-iPSC-CMs に対しエクソンスキップを行ってジストロフィンタンパク回復を誘導し、網羅的解析で見出した細胞増殖、細胞分化に関連する遺伝子の中から、ジストロフィンタンパク回復によって遺伝子発現低下に改善が認められるものを候補遺伝子として絞り込みを行う。さらに、候補遺伝子に対する siRNA を用いた遺伝子ノックダウン研究を行って、心筋細胞における候補遺伝子の低下が、心不全の病態にどのような影響を及ぼすかに関して評価を行う。

### 3. 研究の方法

DMD 遺伝子エクソン 46-55 欠失変異を持つ DMD-iPSC-CMs に対してエクソン 45 に対するモルフォリノ核酸 (PMO) の投与により、ジストロフィン発現回復を誘導し、網羅的解析で DMD-iPSC-CMs で低下が認められた細胞増殖、細胞分化に関連する遺伝子に関する変化を qPCR によって解析し、ジストロフィンタンパク回復によって遺伝子発現低下に改善が認められるものを候補遺伝子として抽出した。

さらに、健常者由来の iPSC 心筋細胞 (Control-iPSC-CMs) を用いて、候補遺伝子に対する siRNA 投与を行い、それぞれの遺伝子抑制を誘導した siRNA 投与 72h 後に Control-iPSC-CMs に関して細胞形態の変化と qPCR による遺伝子発現変化に関して解析を行った。

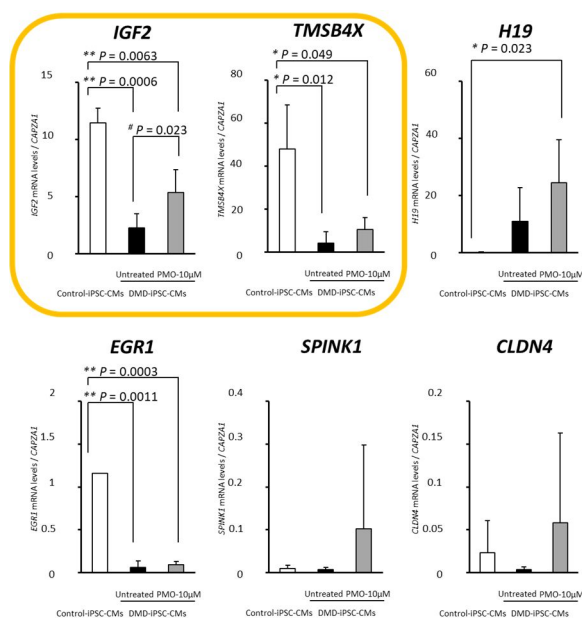


### 4. 研究成果

DMD-iPSC-CMs に対しエクソン 45 スキップを行ってジストロフィンタンパク回復を誘導したところ、網羅的解析で DMD-iPSC-CMs において低下が認められた *TMSB4X* や *IGF2*, *SPINK1*, *EGR1*, *CLDN4* といった細胞増殖や再生に関与する遺伝子の中で、*IGF2* と *TMSB4X* の発現低下はジストロフィンタンパク回復に伴って改善がみられることを見出した。この結果から、ジストロフィンを欠損する DMD-iPSC-CMs における *IGF2* と *TMSB4X* の発現低下は DMD における心筋障害の進展に関与している可能性があると考えた。

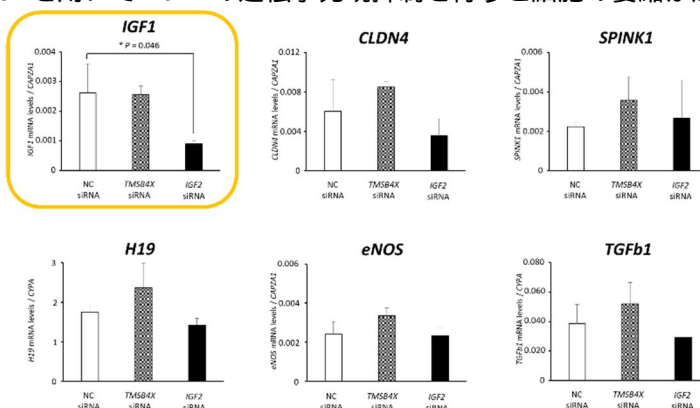
*IGF2* と *TMSB4X* に対する siRNA を、Control-iPSC-CMs に対して投与し、それぞれの遺伝子抑制による変化を評価した。まず、前段階として siRNA による遺伝子抑制効果を確認するため、HEK293 細胞に対して *IGF2*, *TMSB4X* それぞれに対する siRNA を投与したところ、対象の遺伝子発現は 85 - 90% 程度抑制され良好な結果であった。次に Control-iPSC-CMs に siRNA を投与したところ、HEK293 細胞と同程度の良好な遺伝子抑制効果を得ることができた。

*TMSB4X* に関しては、HEK293 細胞における予備実験の際に *TMSB4X* の遺伝子抑制に伴って *IGF2* の発現低下が確認された。このため、*TMSB4X* は *IGF2* の発現を上流で調節している因子である可



能性を考えたが、この *TMSB4X* と *IGF2* の関連性については Control-iPSC-CMs を用いた siRNA 実験の際には確認できず、現時点では *TMSB4X* 低下がどのように心筋障害へ関与するかについてはっきりと示すことはできなかった。

これに対して、Control-iPSC-CMs を用いて *IGF2* の遺伝子発現抑制を行うと細胞の萎縮が起こりやすくなり、また *IGF2* の抑制によって *IGF1* の遺伝子発現も抑制されることが確認された。*IGF1* と *IGF2* は共通の受容体 *IGF1R* を介して細胞内の Erk シグナル伝達を活性化して心筋壁肥厚に影響が考えられている。このため、DMD 患者由来の心筋細胞における *IGF2* 発現の低下は、DMD 患者の拡張型心筋症の病態において心筋壁の菲薄化に悪影響を与える可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Daigo Miyazaki
2. 発表標題 TMSB4X and IGF2 down-regulation in dystrophin-deficient cardiomyocyte derived from DMD
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daigo Miyazaki
2. 発表標題 Gene expression in cardiomyocytes from DMD with exon 46-55 deletion after exon 45 skipping therapy
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎 大吾
2. 発表標題 DMD患者由来心筋細胞における分化・再生関連遺伝子の発現低下と心筋障害への影響に関する研究
3. 学会等名 第14回筋ジストロフィー治療研究合同発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daigo Miyazaki
2. 発表標題 Decrease of differentiation- and regeneration-related genes in dystrophin-deficient cardiomyocytes
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Daigo Miyazaki
2. 発表標題 Decrease of genes associated with differentiation and regeneration in cardiomyocyte derived from DMD
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮崎大吾
2. 発表標題 DMD患者iPS細胞由来の心筋細胞における分化・再生関連遺伝子の発現低下と心筋障害の発症機序に関する研究/Decrease of differentiation- and regeneration-associated genes in dystrophin-deficit cardiomyocyte derived from DMD
3. 学会等名 日本筋学会第4回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮崎 大吾
2. 発表標題 DMD患者iPS細胞由来の心筋細胞における分化・再生関連遺伝子の発現低下とエクソン・スキップ治療後の変化に関する研究
3. 学会等名 第13回筋ジストロフィー治療研究合同発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daigo Miyazaki
2. 発表標題 Gene expression in cardiomyocytes from DMD with exon 46-55 deletion after exon 45 skipping therapy
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	中村 昭則  (Nakamura Akinori)  (10303471)	信州大学・医学部・特任教授   (13601)	
研究 分担者	柴 直子  (Shiba Naoko)  (00639289)	信州大学・医学部・助教   (13601)	
研究 分担者	柴 祐司  (Shiba Yuji)  (70613503)	信州大学・学術研究院医学系・教授   (13601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------