

小児心臓検体の空間オミクス解析及び 疾患iPS成熟化心筋組織による拡張型心筋症の病態解明

大阪大学ヒューマン・メタバース疾患研究拠点・特任准教授

三木 健嗣



[背景]

拡張型心筋症 (dilated cardiomyopathy: DCM) は、心臓の左心室が広がって収縮力が弱くなる病気であり、特に小児のDCMは、子どもの心筋症の中で最も多く、診断後1年以内で約4人に1人、10年以内では約4割が亡くなるか心臓移植を受けるという非常に厳しい経過をたどる。近年では、iPS細胞やオミクス解析（遺伝子やタンパク質などを網羅的に調べる技術）を使った疾患研究が進んできたが、DCM、特に小児DCMに関しては病気の仕組みや治療法の開発がまだまだ不十分である。

[目的]

本研究では、小児DCM患者から得られた心臓組織と患者由来iPS細胞の成熟した三次元心筋組織を用いて、病気の原因や特徴を明らかにし、新たな治療法の手がかりを探すこととする。

[方法]

・小児心臓組織検体のオミクス解析

我々は、小児の心臓移植時に得られたDCM患者4名分 (MYH7変異2名、TNNT2変異2名) の心臓組織を用いて、シングル核RNAシーケンス解析（細胞ごとの遺伝子発現解析）と空間トランск립トーム解析（組織の位置情報を保存した遺伝子発現解析）を実施した。

・患者由来iPS細胞を使ったDCMモデルの構築

オミクス解析と同じ4名の小児患者からそれぞれ採血をさせていただき、そこからiPS細胞を樹立した。各iPS細胞株から心筋細胞に分化させ、工学的な心筋組織 (Engineered Heart Tissue: EHT) を作製した（図1a）。このEHTは3Dプリンターで作ったピラーを使い、そのピラーのたわみから心筋組織の収縮力を測定できるよう工夫している（図1b）。また、TNNT2変異のiPS株に関しては、正常TNNT2遺伝子を強制発現させたiPS細胞株も樹立し、疾患iPS細胞株との比較検討を行った。さらに、患者が有する遺伝子変異を正常な遺伝子に修復したiPS細胞も作製しており、既に1名の患者分の修復株を作製し終え、現在他の3名の疾患iPS細胞株の修復株を作製中である。

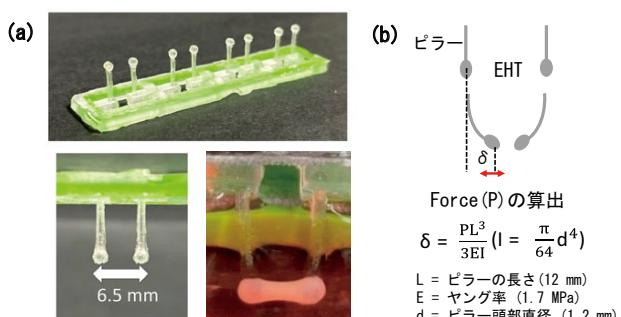


図1. ヒトiPS細胞由来EHT (a), 収縮力計算法 (b)

[結果]

・小児心臓組織検体のオミクス解析

4人の小児DCM患者から得た心臓組織データと公開されている健常者のサンプルデータ（11名分）を比較したところ、小児DCM患者の心筋細胞に特有の細胞集団が確認され、それに関わる遺伝子リストを抽出した。更に空間トランスクリプトーム解析と照合したところ、組織内でのそれらの遺伝子発現は一様ではなく、組織内の位置により不均一なことも明らかになった（未発表データのため図は未掲載）。加えて、心筋細胞以外の細胞集団にも現在注目しており、線維芽細胞や血管内皮細胞、マクロファージ等でも同様の解析を進めている。

・患者由来iPS細胞を使ったDCMモデルの構築

4名の小児患者由来iPS細胞の樹立と心筋細胞への効率的な分化を達成した（全ての株でcTNT陽性率80%程度）。次に、免疫染色によるサルコメア構造解析において、TNNT2変異をもつ患者由来のiPS細胞由来心筋細胞では、正常TNNT2遺伝子を強制発現させたiPS細胞由来心筋細胞と比べサルコメアの異常が多く見られた。更に、カルシウムの動きや収縮力を調べたところ、心筋の働きに特徴的な障害（振幅の低下、収縮の遅れ）も確認された。加えて、iPS-EHTによる収縮動態解析では、疾患株において収縮力の低下を認めた。

[今後の予定]

1. 全ての疾患iPS細胞由来心筋細胞及びEHTにおいて、修復株との比較検討を実施する。
2. オミクス解析から抽出した遺伝子やシグナルパスウェイに対して介入することで、これらの表現型を改善できるかを解析する。
3. これらの変異に対応するDCMモデルマウスを作製し、介入実験を実施する。
4. 3年以内を目処に論文化を目指す。