

小児心臓組織検体の空間オミクス解析と疾患 iPS 細胞を用いた拡張型筋症の病態解明

三木健嗣

大阪大学 ヒューマン・メタバース疾患研究拠点

【研究の背景】

拡張型心筋症(DCM)は、左室の収縮不全と左室内腔の拡張を特徴とする心筋症であり、特に小児 DCM は小児心筋疾患で最も多く、診断後 1 年で約 26%、診断後 10 年で 38%が死亡、あるいは心臓移植到達と極めて予後不良である。近年の iPS 技術やオミクス解析の急速な発展により、DCM に関しても in vitro において詳細な解析は試みられているが、病態解明および病態に基づいた治療法の開発は進んでいない。その理由としては主に 2 つあると考えており、①ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞が非常に未熟なため成人発症の DCM の病態再現が困難であること、②通常のシングルセル解析では、空間座標の欠落によりその組織内の病態のメカニズムとなりうる組織内分布や微小環境を直接検証することはできないこと、があると考えている。

【目 的】

代表者が所属する研究室ではこれまでの小児心臓移植の実績から複数の小児 DCM 患者の心臓組織検体を有している。よって、本研究では小児 DCM 患者の心臓組織検体の空間オミクス解析、シングル核解析及び疾患ヒト iPS 細胞由来成熟化心筋組織を用いたアプローチで拡張型心筋症の病態解明と治療法の探索を実施する。

【方 法】

1: 小児心臓組織検体のマルチオミクス解析によるターゲット因子の探索

我々はこれまで全ての心臓移植患者の心臓組織検体を保存しており、本研究では 4 名の小児 DCM 患者の心臓組織検体を用いて空間トランスクリプトーム解析とシングル核解析を実施した。

2: 疾患 iPS 細胞を用いた in vitro での拡張型心筋症モデル評価系の構築

小児 DCM 患者の病態を in vitro で再現・評価するには、新生児レベルまで成熟した心筋組織を再現よく構築し、定量的に評価できる系が求められる。よって、本研究では、オミクス解析に用いた小児 DCM 患者の末梢血からヒト iPS 細胞を樹立し、心筋細胞へ分化させた後、心筋細胞及び三次元心筋組織化を行い DCM の表現型を解析した。三次元心筋組織化に関しては、3D プリンターを用いたピラーを自作しており、ピラーの動きから収縮力を定量的に解析することが可能である。また、患者由来 iPS 株に変異遺伝子に対して正常遺伝子を恒常発現させる株を作成し、患者由来株の表現型が改善するかを評価した。

【結 果】

1: 心臓移植時に採取された 4 名の遺伝子変異を有する小児 DCM 患者(TNNT2 変異 2 名、MYH7 変異 2 名)の FFPE 組織及び凍結心臓組織を用いてシングル核解析と空間トランスクリプトーム解析を実施し、健常人のコントロールサンプルを加えて解析したところ、小児 DCM 患者に特有の細胞集団を認め DEG リストを抽出した。更に組織切片へマッピングしたところ、DCM 患者心臓組織が一様な組織ではなく heterogeneous な組織であることも認めた。現在、これらを精査し特定のシグナル

パスウェイ等絞り込みを実施している。

2: 上記 4 名の患者全員から iPS 細胞を作成し、効率的な心筋分化誘導ができることを確認した (cTNT 陽性率 80%以上)。TNNT2 変異 2 名の患者の iPS 細胞を先行して解析を進めており、これらの疾患 iPS に関して正常の TNNT2 遺伝子を強制発現させた株もそれぞれ樹立した。これらの株を比較すると、疾患 iPS 由来の心筋細胞において異常サルコメアを有する心筋細胞が有意に多いことが認められた。次に、各心筋細胞のカルシウム動態と確認したところ、疾患 iPS 心筋細胞において心不全組織に特徴的な振幅の減少と、最大蛍光強度到達までの時間の延長を認めた。更に、三次元組織解析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。

【まとめ】

DCM 患者由来 iPS 心筋細胞及び心筋組織を用いて in vitro における評価系の構築は達成でき、遺伝子治療を模倣した強制発現株によりその表現型が改善することも認められた。今後は、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。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

DCM 患者に共通するターゲット因子・シグナルパスウェイの同定は今後の研究次第であるが、TNNT2 変異を有する iPS 株に対して正常 TNNT2 遺伝子を導入することで、in vitro での機能改善が認められた。このことにより、TNNT2 変異の患者に対しては AAV 等による遺伝子治療の可能性は考えられる。

【参考・引用文献】

Malinow I, Fong DC, Miyamoto M, Badran S, Hong CC., Pediatric dilated cardiomyopathy: a review of current clinical approaches and pathogenesis., *Front Pediatr.* 2024 Jun 19;12:1404942.

Koenig AL, Shchukina I, Amrute J, Andhey PS, Zaitsev K, Lai L, Bajpai G, Bredemeyer A, Smith G, Jones C, Terrebonne E, Rentschler SL, Artyomov MN, Lavine KJ., Single-cell transcriptomics reveals cell-type-specific diversification in human heart failure., *Nat Cardiovasc Res.* 2022 Mar;1(3):263-280.

Hasegawa M., Miki K.*, Kawamura T., Sasozaki Takei I., Higashiyama Y., Tsuchida M., Kahino K., Taira M., Ito E., Takeda M., Ishida H., Higo S., Sakata Y., Miyagawa S. Gene correction and overexpression of TNNI3 improve impaired relaxation in engineered heart tissue model of pediatric restrictive cardiomyopathy. *Develop Growth Differ.* 2024 Feb;66(2):119-132.