

生体におけるタイプ別心筋の分化制御機構

[1] 組織

代表者：竹内 純
 (東京医科歯科大学・難治疾患研究所)
 対応者：松本 健
 小椋 利彦
 (東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 13 万円，旅費 0 円

[2] 研究経過

ゲノム医学・生化学・分子生物学・遺伝子工学研究の発展により、遺伝子変異箇所が多くの人先天心疾患の重症化原因となっていることがわかってきた (van Weerd, *Cardiovas. Res.* 2011; Takeuchi, *Nat. Commun.* 2011; Bruenau., *Nature* 2008)。このような心臓疾患の発症起因を明らかにするために、*in vitro* で心臓形態を構築する技術開発がなされてきた (van den Brink, *Nature* 2020; Rossi, *Cell Stem Cell* 2020; Lee, *Nat. Commun* 2020; Andersen, *Nat. Commun.* 2018; Takeuchi & Bruneau, *Nature* 2009)。しかしながら、現行モデルは胚発生早期の未熟な組織塊 (オルガノイド・ガストルノイド) であり、かつ、ヒトを代表する哺乳類の生体を反映した機能性心臓組織構築 (4つの区画化形態を付帯したオルガノイド) は未だ成功していない。その理由は、発生生物学知見が軽視されてきたからであり、かつ、心室-心房筋のみならず左右心室を同時に分化させる技術が開発されていないからである (図1)。

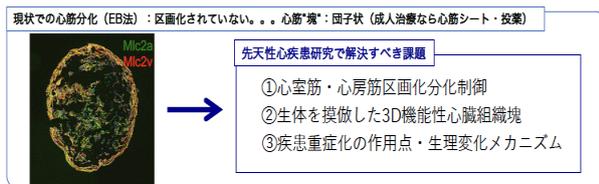


図1：iPS由来細胞塊を用いた研究の課題

本研究は申請者が継続して報告してきた一連の研究：特定因子を用いて心室筋・心房筋誘導と左右心室誘導実績 (Morita, *JMCC* 2016; Koshiba-Takeuchi, *Nature* 2009; Takeuchi, *Nat. Commun.* 2011;

Development 2005; 2003)、および2021年度東北大加齢医学研究所共同研究結果 (図2) を基盤としてヒト研究に応用すべく発展させたものである。

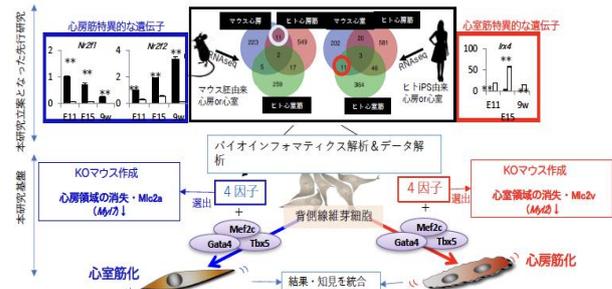


図2：先行研究技術を用いた心房-心室誘導

本研究は先行研究の萌芽的な結果を基盤として、
 ①：心筋筋塊・心室筋塊形成、および4区画化マウス型機能性心臓組織塊の構築：実験発生生物学知見をもとに哺乳類様心臓形態を持った *in vitro* 3D組織塊 (オルガノイド) を樹立する。そのために、本研究の受け入れ研究者 (対応者) と議論の場を設けて強制発現系コンストラクトのデザイン、および作成する。形状および生理学解析から評価する。また、同時に線維芽細胞に強制発現させリプログラム能力を調査する。
 ②：心房筋・心室筋候補因子の遺伝子破壊マウスの作成：iGONADの技術を発展させ、4つに絞り込んだ候補因子のカルテット KOマウスを作成する。その後、3D心臓形成状態の変化を評価する。

以上の2つのテーマを発展させて、将来的にはヒト先天性心疾患発症メカニズム、緩和治療へのスクリーニングモデル、ウイルス・炎症などによる重症化発症の解明に期待されるモデル樹立を目指す。

以下、研究活動状況の概要を記す。

加齢医学研究所神経機能情報分野講師の松本健博士に遺伝子発現プラスミドの構築、シグナル経路のイメージングによる可視化、蛋白質定量法等の技術提供を依頼し本解析に応用した。

また2か月に1度程度定期的にZOOMミーティングを行い進捗状況の確認および研究計画について議論した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す3つの研究成果を得た。

a : 心室-心房の誘導

まず、候補遺伝子を強制発現させることで心房筋のみ、および心室筋のみ誘導が可能か調べた。通常の誘導方法(図3左)では主にMlc2aが細胞塊表層に局在する(心室筋特異的タンパク質に対する抗体(Mlc2v:赤)・心房特異的タンパク質に対する抗体(Mlc2a:緑)を免疫組織化学法を用いて染色)。内部細胞は未分化細胞であり、心室筋細胞と心房筋細胞はランダムに存在する。興味深いことに、4つの心房候補遺伝子を強制発現させるとMLC2A陽性細胞のみ、4つの心室筋候補遺伝子を強制発現させるとMLC2V陽性細胞のみ誘導された(データ開示省略)。現在、mRNAseqを元にトランスクリプトーム解析中である。次に、胚発生で重要な前後軸情報を保って、前述した候補遺伝子を強制発現させながら分化誘導させると、2つの形状を持った心筋塊を得ることができ、さらにMLC2V陽性細胞とMLC2A陽性細胞は区別されていた(図3右から2つめ)。

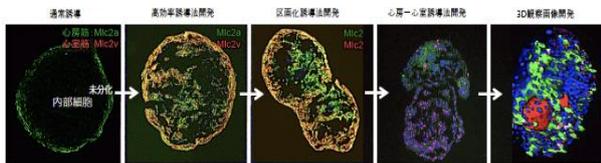


図3: ヒトiPS細胞を用いた心室-心房誘導技術

申請者の研究室は電気生理学解析(optical mapping Ca-imaging)を用いた心機能評価の実績がある(Morita, *submitted* 2021; Lee, *Nat. Commun.* 2020; Kuroyanagi, *Sci. Rep.* 2020; Morita, *JMCC* 2016)。電気生理学解析を用いて、機能性の評価を行った(図4)。その結果、MLC2V陽性細胞領域では心室筋様の心拍動、MLC2A陽性細胞領域では心房筋様の心拍動が見受けられた(Morita, *in preparation* 2023; Kakeno *in preparation* 2023:特許申請準備中 2023)。

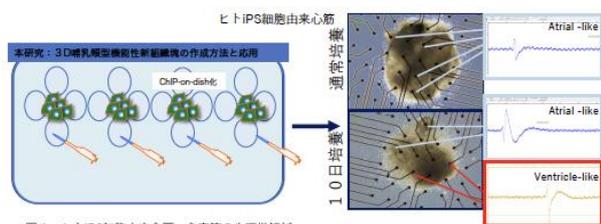


図4: ヒトiPS細胞由来心室-心房筋の生理学解析

b : ex utero 遺伝子破壊法を用いた候補因子の遺伝子

KO マウスの作成

前回の課題であった、多重遺伝子破壊モデル生物の作出について、iGONAD法(松山誠室長:重井医学研究所との共同研究)を応用することで可能であると推測された。条件設定を整え同腹マウスにて多遺伝子を同時にノックアウト(KO)する技術を開発した(図5: Morita et al., *submitted* 2023)。4つの心房形成候補遺伝子を同時にKOしたマウス胚では心房形態が完全欠損、さらに4つの心室形成候補遺伝子を同時にKOしたマウス胚では心室形態が完全に欠損していた(データ開示省略)。現在、組織学解析およびトランスクリプトーム解析中である。

- * CHOPxCHOPにてgRNAをデザイン
- * IDTにオーダー
- * sgRNA合成
- * in uterus 遺伝子導入
- * 発生過程 or F0で解析



図5: iGONAD法を用いた多重遺伝子KOマウスの作成と整体モデルの解析

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究は、国内外研究者との交流が飛躍的に活性化し、フランス国、および、米国との国際共同研究プロジェクトに発展した(以下参照)。

- ① 二国間交流事業 オープンパートナーシップ共同研究: フランス(2022~2024年度・日本学術振興会)「先天性心臓四肢疾患の理解:3D シングルセル解析を用いた心臓-血管-上肢起源の研究」(代表 竹内 純): Buckingham 教授: パスツール研究所, Kelly: Aix-Marseille 大/IBDM との共同研究。
- ② 国際共同研究加速基金(国際共同研究強化(B))(2012~2025年度・日本学術振興会)「先天性頭頸部-心臓-上肢疾患解明に向けたエピゲノム因子の制御機構の理解」(代表 竹内 純): Bruneau 教授: グラッドストーン研究所/UCSF との共同研究。

[4] 成果資料

現在、投稿中。