

【目的】心不全に対する治療法の進歩に伴い、心不全患者の予後やQOLは大きく改善してきた。しかし、現在の標準的治療薬として用いられる β 遮断薬やレニンアンジオテンシン系阻害薬は収縮不全を伴った心不全においては高い有効性を示すものの、高齢者の心不全の主体である拡張不全型心不全では有効性が乏しいことが明らかになっている。そのため新規の治療薬開発が必要であるものの、拡張不全型心不全の病態は未だに不明な点が多く残されており、治療標的の同定も困難な状態である。そこで本研究では、ヒト多能性幹細胞より心臓構成細胞を作出し、CRISPR/Cas9システムを用いた遺伝子ノックアウトスクリーニングを行い、拡張不全型心不全の病態に寄与する遺伝子の候補を探索することで、新規治療標的となりうる分子生物学的機序を明らかにすることを目的として研究を実施した。

【方法】健康人由来のヒト人工多能性幹(iPS)細胞に対して、CRISPR/Cas9システムによるゲノム編集を用いてAAVS1領域に誘導性 Cas9 発現配列を組み込んだ iPS 細胞株を複数作製した。これらの細胞株にドキシサイクリン添加を行い、フローサイトメトリーおよび免疫染色にて Cas9 の発現確認を行った。ヒト心臓線維芽細胞はヒト iPS 細胞より Wnt パスウェイ関連低分子化合物およびレンチノイン酸を用いて心外膜系譜細胞を誘導し、線維芽細胞成長因子を用いて誘導を行った。リアルタイム PCR、フローサイトメトリーによる遺伝子発現および顕微鏡による形態観察にてヒト心臓線維芽細胞の評価を行った。ヒト心筋細胞はヒト iPS 細胞より Wnt パスウェイ関連低分子化合物により誘導を行い、Wnt アゴニスト存在下の低密度培養で増殖を行ったのちに実験に使用した。全キナーゼを標的とした遺伝子ノックアウト Cas9 レンチウイルスプールライブラリーより作製したレンチウイルスベクターをヒト心臓線維芽細胞、ヒト心筋細胞に導入し、Puromycin による薬剤選択を行った後にヒト心筋細胞に対してはグルコース、エンドセリン 1、コルチゾールにて 3 日間刺激を行った。その後 Brefeldin A にて処理後に細胞を固定し、抗 NT-ProBNP 抗体および抗 TNNT2 抗体にて免疫染色を実施した。これらの細胞をフローサイトメトリーにて TNNT2 陽性集団より NT-ProBNP の強/弱信号分画の細胞を各々回収し、NGS を用いてライブラリーを標的としたディープシーケンスを実施した。得られた結果より MAGeCK プログラムを用いて各遺伝子における RRA スコアを算出した。計 4 回のスクリーニングを実施し、最終的な RRA スコアを算出した。

【結果】当初の計画に従い誘導性 Cas9 発現ヒト多能性幹細胞の作出に成功した。しかし、細胞集団内で Cas9 を安定して誘導することが困難であったことから、計画を変更し、分化誘導後の細胞に直接 Cas9 および gRNA を発現するベクターを導入することとし、研究を継続した。ヒト iPS 細胞から心筋細胞を誘導し、さらに幼弱心筋細胞の増殖を引き起こすことで大量の心筋細胞を作出することに成功した。これらのヒト心筋細胞を用いて行った全キナーゼを標的とした CRISPR スクリーニングでは拡張不全型心不全の病態形成に関与が疑われる遺伝子候補の同定に成功した。ヒト心臓線維芽細胞は既存の報告に基づき誘導することは可能であったものの、長期培養により心外膜系譜様細胞への形質転換が認められたため、今後培養プロトコルの最適化が必要と考えられた。

ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞を用いた心不全発症関連遺伝子探索のための全キナーゼ CRISPR スクリーニング

