

Title	Gene correction and overexpression of TNNI3 improve impaired relaxation in engineered heart tissue model of pediatric restrictive cardiomyopathy
Author(s)	三輪, 然
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/96305
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏名 Name	三輪（長谷川） 然
論文題名 Title	Gene correction and overexpression of <i>TNNI3</i> improve impaired relaxation in engineered heart tissue model of pediatric restrictive cardiomyopathy (トロポニンI3の変異遺伝子修復と正常トロポニンI3強制発現が小児拘束型心筋症の心筋組織モデルにおける弛緩障害を改善する)
論文内容の要旨(Abstract of Thesis)	
〔目的(Purpose)〕	
<p>拘束型心筋症 (Restrictive cardiomyopathy; RCM) は収縮機能を維持した心室拡張不全をきたす心筋症である。小児RCMの発症率は小児心筋症の中で4.5%と稀な疾患であるが予後不良である。RCMには現在有効な内科治療がないため診断後は心移植が最終治療となるが、本邦における深刻なドナー不足のため多くの症例は左室補助人工心臓装着後に心移植まで長期間の待機を余儀なくされる。そのため、RCMの病態モデルの開発、病態解明、さらに新規治療法の開発が求められている。RCMの発症機序としてはサルコメアタンパク質の遺伝子変異が報告されている。その中でもトロポニンI3 (TNNI3) 遺伝子における変異の報告が最も多く、さらにTNNI3変異RCMは予後不良である。TNNI3は心筋収縮動態の抑制系、つまり心筋弛緩に関与する唯一のタンパク質でありRCMの拡張不全という表現型に極めて重要な働きをしていると考えられているが、現在TNNI3変異RCM由来のヒトiPS細胞を用いた研究は報告されていない。そこで今回TNNI3変異をもつ患者から作成したiPS細胞由来心筋組織がRCM患者に特有の臨床的特徴である拡張障害を示し、そのin vitro病態モデルとして有用であるかどうか検討し、さらにTNNI3変異遺伝子を修復、もしくは正常TNNI3を強制発現することでその拡張障害の表現型が改善するか否か確認することを目的とした。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>当院で心移植に至った小児RCM症例のうち、TNNI3変異(c. 508C>T, p. R170W)が病的バリエーションと同等されている患者由来疾患特異的iPS細胞を樹立した(R170W株)。このiPS細胞株を用いて、CRISPR-Cas9によるゲノム編集技術により変異を修復したIsogenic株、また正常TNNI3をベクターで導入し強制発現させたTNNI3強制発現株を樹立した。それぞれを心筋細胞へ分化誘導させた。各株とも高い誘導効率で分化できることを確認し、Ca²⁺インジケータを用いてCa²⁺動態を評価すると、R170W心筋は不全心の特徴とされる最大蛍光強度の低下、最大蛍光強度までの時間の延長を認め、またin vitroでの弛緩障害の指標と言われるCa²⁺濃度の減衰時間の延長を認めた。これらの結果から、R170W心筋がRCMの拡張障害を反映していることが示唆された。Isogenic心筋、TNNI3強制発現心筋において、これらR170W心筋で認められたCa²⁺動態の有意な改善を認めた。次に、これらの心筋細胞を用いてより成熟した心筋組織(Engineered heart tissue; EHT)を作成し力学的測定によって弛緩障害が捉えられるかを確認した。心筋細胞を分散し鋳型を使ってピラーに接着する6.5mm幅のEHTを作成した。それぞれのEHTにおいてウェスタンブロットによりTNNI3の発現を確認した。EHTは培養8日目頃より拍動を始め、培養14日目にビデオ顕微鏡で撮像しそのピラーの動きからEHTにかかる力を算出した。ピラーの移動距離(δmm)は $\delta = PL^3/3EI$ ($I = \pi d^4/64$) (P;ピラーにかかる力, L;ピラーの長さ, E;ヤング率, d;ピラー頭部の直径)で表され、この計算式よりピラーにかかる力(P)を測定した。まずピラーが最大移動距離にある時点、つまり最もEHTが収縮している時の力を測定すると、R170W EHTとIsogenic EHT、TNNI3強制発現EHTとで有意差は認められなかった。ピラーが最大移動距離からもとの位置にもどるまでの時間、つまりEHTの弛緩時間はR170W EHTで有意に延長を認めた。また、ピラーの移動距離(δ)と力(P)が比例関係にあることを用いてピラーの移動波形を力の波形へ変換し、収縮期にかかる力と拡張期にかかる力を比較した。R170W EHTは全体の力に対する拡張期における力の比率の増大、また収縮期における力に対する拡張期における力の比率の増大を認め、これは拡張期にかかる力が増大していることを示唆した。EHTにおける検討において、R170W EHTは弛緩にかかる時間の延長、また弛緩の際にかかる力の増大を認めこれはRCMの拡張障害を反映していると示唆された。また、これらの収縮動態はIsogenic EHT、TNNI3強制発現EHTにおいて改善を認めた。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>TNNI3 R170W変異RCM由来のiPS心筋細胞、心筋組織モデルはRCMに特徴的な拡張障害の表現型を捉えin vitro病態モデルとして有用であった。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 三輪(長谷川) 然

	(職)	氏名	
論文審査担当者	主査	大阪大学教授	宮川 繁
	副査	大阪大学教授	奥山 宏臣
	副査	大阪大学教授	島津 研三

論文審査の結果の要旨

小児期発症拘束型心筋症(RCM)は予後不良で詳細不明である。多くの症例でTNNI3遺伝子変異の指摘があるがそのin vitroモデルの報告はない。本研究の目的はTNNI3変異RCM患者から作成したiPS細胞由来心筋細胞や心筋組織がRCMに特有の拡張障害を示しうるかを検討し、さらに変異遺伝子修復もしくは正常TNNI3強制発現によりその表現型が改善するか確認することである。

TNNI3変異(p. R170W)が同定された小児RCM患者由来疾患特異的iPS細胞を樹立した(R170W株)。更に、その株にCRISPR-Cas9を用いて変異を修復したIsogenic株、正常TNNI3をベクターで導入し強制発現させたTNNI3強制発現株を樹立した。心筋細胞のCa²⁺動態において、R170W心筋はin vitroでの弛緩障害の指標とされるCa²⁺濃度減衰時間の延長を認めた。心筋組織の収縮動態では、R170W心筋組織は弛緩時間延長と弛緩の力の増大を認め、拡張障害を反映していると示唆された。これらCa²⁺動態、収縮動態の変化はIsogenic株、TNNI3強制発現株において改善した。本研究はTNNI3変異RCM in vitro病態モデルを提唱し、今後の遺伝子治療への可能性を示すものと考えられ学位に値するものと認める。