

心筋症を誘発する自己炎症性疾患 HOIL-1L 遺伝子異常の心筋症発症・進行機序の解明

馬場志郎

京都大学 小児科

【研究の背景】

拡張型心筋症は心筋細胞の大小不同、線維化や索状配列を呈し、心室拡大と心収縮低下の臨床所見を認める。拡張型心筋症の約半数において、その病因が特定困難であるとされている。その一方、家族性拡張型心筋症における原因遺伝子の特定は徐々に進んできており、家族性拡張型心筋症患者の約 20%に何らかの遺伝子異常が同定されるようになった。変異の多くは直接心収縮に関連するサルコメアタンパクをコードする遺伝子や心収縮力を伝達する役割を担うジストロフィン関連タンパクをコードする遺伝子であるが、近年、直鎖状ユビキチン鎖合成複合体(linear ubiquitin assembly complex: LUBAC)の構成分子である HOIL-1L の変異で心筋症が発症するとの報告がされている¹⁾。同疾患では、自己炎症症候群症状と免疫不全・拡張型心筋症といった特徴的な臨床症状を呈するとされているが²⁾、その程度は様々である。しかし、拡張型心筋症に関しては心不全による死亡や心移植など、患者の生命予後に心筋症の存在が大きく影響を与えうると考えられている。患者の生検もしくは剖検検体において、心筋細胞内に異常多糖類(アミロペクチン)の蓄積が認められるとされているが³⁾、心筋症発症との関連は明らかでなく、現時点では心筋症発症の機序は全く不明であり、その病態解明が強く望まれる。

【目 的】

HOIL-1L 異常症における拡張型心筋症発症の機序を解明すること。

【方 法】

HOIL-1L 欠損患者から作製した iPS 細胞はすでに樹立済みであるが、心筋細胞分化の過程で、心筋細胞以外の細胞が同時に作製される。HOIL-1L 欠損患者においては心筋細胞だけでなく、骨格筋細胞へのアミロペクチン沈着を伴うミオパチーも認めるため、心筋細胞と細胞内代謝経路が類似しているマウス骨格筋由来の筋芽細胞株(C2C12)を用いて初期の実験を行なった。その後、拡張型心筋症発症のモデルとしては患者由来 iPS 細胞を用いた。

1) C2C12 細胞から HOIL-1L 遺伝子異常株の作製と維持培養、骨格筋細胞分化

HOIL-1L 遺伝子異常患者の過去報告で重症心不全から心移植に至った重症表現系を示すエクソン 7 の c.896_899del.AGTG 変異、エクソン 5 の c494del.G 変異を選択し、CRISPR/Cas9 システムを用いて C2C12 細胞からノックアウト株(C2C12-KO)を作製した。C2C12、C2C12-KO ともに DMEM に 20%牛血清(FCS)を添加した培養液で維持培養を行い、骨格筋細胞分化は、DMEM に 2%ウマ血清を添加した分化培地で培養し、骨格筋細胞を作製した。骨格筋細胞分化の評価については Fusion Index を用いて行なった。

2) 細胞内アミロペクチン沈着評価

分化 5 日目の骨格筋細胞を PAS 染色し、細胞内アミロペクチン沈着の評価を行なった。また同時に Glycogen assay kit を用いて分化骨格筋細胞内のグリコーゲン量を測定した。

3) 定量的 PCR(qPCR)

骨格筋細胞の分化評価について定量的 PCR 法で評価した。骨格筋細胞分化に関わる、MyoD、MRF4、Myogenin について分化経時的に評価した。

4) iPS 細胞の維持培養と心筋細胞分化

HOIL-1L 欠損患者由来 iPS 細胞(HOIL-iPS)とコントロール iPS 細胞(Contril-iPS)をマトリゲルコートした培養皿で無血清培地を用いて維持培養を行なった。心筋細胞分化は、RPMI 培地に B27 または B27 minus を添加し、心筋細胞分化を行なった。心筋細胞純度を上げるため、分化 20 日目の心筋細胞を 10 日間グルコース(-)、ラクテート添加培地で培養し、さらなる心筋細胞維持は、RPMI に B27 を添加した培地で培養した^{4,5)}。

5) RNA sequencing

骨格筋分化 5 日目の C2C12 と C2C12-KO を回収し、RNA を抽出して RNA sequencing(RNAseq)をおこなった。RNA sequencing の解析については外部委託した。

【結 果】

C2C12 と C2C12-KO から分化した骨格筋細胞の比較では、C2C12-KO 骨格筋細胞に有意なアミロペクチン沈着は認められなかった。その一方、C2C12-KO 骨格筋細胞で成熟度を示す筋管形成指標(Fusion Index)が低い傾向を認め、定量的 PCR においては筋芽細胞から筋管形成に関わる遺伝子のうち、MRF4 の発現低下を認めた。MRF4 発現低下から、C2C12-KO から分化する骨格筋細胞がより未熟出る可能性を考え、成熟骨格筋タンパクである Myosin heavy chain(MHC)の発現を確認した。Western blotting 法において C2C12 骨格筋細胞に比べて C2C12-KO 骨格筋細胞でより有意に MHC 発現低下を認めた。以上から、HOIL-1L 遺伝子異常は骨格筋の分化に影響することが判明した。このことを遺伝子発現で解明するため分化 5 日目の RNAseq を C2C12 骨格筋細胞、C2C12-KO 骨格筋細胞を用いて行なった。その結果、C2C12-KO 骨格筋細胞において骨格筋形成に関わる遺伝子の発現低下を認めるとともに、組織線維化に関わる Serpine2、成熟骨格筋構造の一つであるサルコメア構造に関わる Myoglobin の発現が大きく変動していることが明らかとなった。

iPS 心筋細胞においても C2C12 細胞同様、Control-iPS 由来心筋細胞に比べて HOIL-iPS 由来心筋細胞において有意なアミロペクチン沈着は認めず、Glycogen assay においても有意なグリコーゲン蓄積は認めなかった。一方、分化心筋細胞の形態を詳細に検討すると、HOIL-iPS 由来心筋細胞の細胞サイズが Control-iPS 由来心筋細胞と比べて明らかに大きく多核傾向であった。このことは、HOIL-iPS 由来心筋細胞が Control-iPS 由来心筋細胞に比べて、より未熟な心筋細胞であることが示唆された。

【考 察】

HOIL-1L 欠損患者の心筋細胞内にアミロペクチン沈着を認めることは剖検例から周知の事実であり、この蓄積が他の代謝疾患と同様に心筋症発症の引き金となると考えられてきた。しかしながら、短期培養系では同様のアミロペクチン沈着を有意に証明することは不可能であった。これは、我々が用いる培養系が生体と異なって、短期の経過しか観察できないこと、C2C12 から分化する骨格筋細胞や iPS 細胞から分化する心筋細胞が完全な成熟分化細胞ではなく、やや未分化性を有する分化細胞であることから、アミロペクチン蓄積が認められなかったと考察される。

一方、C2C12-KO を用いた実験系では、筋管形成に関わる遺伝子発現の低下が C2C12-KO 骨格筋細胞で明らかに認め、HOIL-1L 遺伝子が骨格筋細胞の成熟に大きく関与する可能性が明らかとなった。C2C12-KO 骨格筋細胞では骨格筋成熟マーカーである MHC が著名に低下し、分化した骨格筋が未熟だけでなく、脆弱かつ機能低下を示す可能性が示唆された。この結果について心筋細胞においても応用できるか、HOIL-1L 欠損患者 iPS 細胞を用いて実験したところ、成熟度合いが低い心筋細胞が HOIL-iPS 細胞から有意に出現し、多くの心筋細胞で多核であることを考えれば、収縮拡張能が低い心筋細胞が分化していると考えられた。C2C12 細胞を用いた RNS seq の結果もふまえて、HOIL-1L 欠損患者の心筋細胞は正常人と比べて、より未熟かつ脆弱であり、機能的にも劣る可能性がある。また HOIL-1L 欠損患者の臓器の一部は NF-

κB の刺激で有意にアポトーシスを起こすことが知られており、この脆弱と思われる心筋細胞も生活環境の様々なストレスでアポトーシスが誘導され、将来的な心不全に結びつく可能性が示唆された。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

これまでの先行研究では、HOIL-1L 異常症患者の剖検または生検検体において心筋・骨格筋のアミロペクチンの蓄積が確認されているのみであり、生体から病態が進行する心筋組織を採取する困難さから、その蓄積機序については全く不明であった。我々の結果は、マウス骨格筋由来の筋芽細胞株 C2C12 細胞および HOIL-1L 変異 iPS 細胞由来心筋を利用することにより、HOIL-1L 異常症における心筋症発症の機序に迫ることは新たな知見となる。また、HOIL-1L 遺伝子異常は拡張型心筋症の予後を決定する大きな因子であり、その機序解明は患者への治療介入の方法を考えるための第一歩となりうる。また本研究は、他疾患かつ同様の細胞内蓄積型心筋症は多数の患者さんが存在し、それら患者さんに対する研究や治療の方向性を決定する意義ある研究といえる。

【参考・引用文献】

1. Nilsson et al. Annals of Neurol 74: 914-919, 2013
2. Boisson et al. Nature Immunol 12: 1178-1189, 2012
3. Krenn et al. J Neurol 2018;265:394-401
4. Lian et al. Nature Protocols 2013;8:162-175
5. Tohyama et al. Cell Stem Cell 2013;12:127-137