

疾患 iPS 細胞を用いた LMNA 変異拡張型心筋症の治療薬候補化合物探索

伊藤正道

東京大学医学部附属病院 循環器内科

【研究の背景】

拡張型心筋症 (Dilated cardiomyopathy; DCM) は、進行性に心臓の収縮異常と不整脈を来す難治性の心疾患であり、病態に則した治療法の開発は進んでいない。特に心臓移植に至る原因疾患の約 7 割を DCM が占めており、その新規治療法の開発は重要な課題である。我々は先行研究で、DCM 患者の約 1 割を占めるラミン遺伝子 (*LMNA*) 変異を有する患者は、 β 遮断薬や ACE 阻害剤に代表される既存治療に応答せず、極めて予後不良であることを報告した¹⁾。DCM の病因は多様であり依然明らかになっていないが、我々は DCM 患者の診断時の心筋生検検体を用いた検討で、心筋細胞の DNA 損傷の程度が高度な患者ほど予後が悪いことを見出している²⁾。また、遺伝子改変マウスを用いた検証で、DNA 損傷修復酵素 (*Xrcc1*) の心臓特異的ノックアウトマウスに圧負荷を誘導すると高度な心機能低下を示したことから³⁾、心筋細胞の DNA 損傷蓄積は心不全発症の分子機序の一つであることが示唆されている。

【目 的】

本研究の目的は、DCM の新規治療薬候補化合物を同定することである。

【方 法】

我々は本学に通院中の *LMNA* 変異陽性 DCM 患者から iPS 細胞を作成した。対象として *LMNA* 変異を CRISPR/Cas9 を用いて修復したコントロール株を作成した。DCM 株および修復株を心筋細胞に分化誘導後、DNA 損傷程度を DNA 二重鎖切断マーカーである γ H2AX の免疫染色に評価したところ、DCM 株でより高度な DNA 損傷が蓄積していることが判明した。また、iPS 心筋細胞からなる心筋細胞シートを作成し機能解析を行ったところ、DCM 株で収縮能低下を認めた。以上から、DCM 患者由来 iPS 心筋細胞には、患者個体での心筋細胞の異常が反映されていると考えられた。

この DCM 株の細胞を用い、DNA 損傷を軽減させる化合物をスクリーニングすることによって、DCM 治療候補化合物の同定を試みることにした。マルチウェルプレートに *LMNA* 変異 iPS 心筋細胞を播種し、市販の化合物ライブラリー (Selleck 社 DNA damage/repair library) を投与後、心筋細胞マーカー TNNT2 および γ H2AX の染色を行った。心筋細胞核内の DNA 損傷は、PerkinElmer 社 Operetta により、核内の染色ドットの個数として検出・定量化を行った。

【結 果】

175 化合物 (10 μ M) を 1 週間投与し染色する実験を 3 回行い、溶媒投与条件と比較して DNA 損傷を軽減させた化合物をヒットとして検出したところ、8 化合物を同定した。これらの化合物を、同変異を持つ別のクローンに投与し、再現性が得られた化合物が 3 化合物存在した。これらについて濃度依存性を確認したところ、既存薬である核内受容体のアゴニスト X が濃度依存的に DNA 損傷を軽減させる効果を有することが判明した。

【考 察】

疾患特異的 iPSC 細胞による疾患モデリングによって、これまで本邦で軟骨無形成症⁴⁾や筋委縮性側索硬化症⁵⁾の新たな治療候補化合物が見出され、臨床試験への移行が試みられている。我々が指標した「心筋細胞の DNA 損傷蓄積」という DCM の細胞表現型は、臨床検体を用いた検証で予後と関連することが示されており、ヒット化合物は臨床的に有用な可能性が高い。

本研究のスクリーニングでは、化合物の薬物動態や、in vivo モデルでの機能・予後改善効果を示すに至っておらず更なる検討の余地があるものの、ヒット化合物 X は既存薬であることに加え、過去の文献で LMNA 変異早老症患者の線維芽細胞の DNA 損傷を軽減し核異常を是正することが報告されていることから、DCM および心不全を標的としたドラッグ・リポジショニングの見込みは十分にあると考えられる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

拡張型心筋症は指定難病であるにも関わらず、病態に基づいた治療薬の開発は不十分で、遺伝子変異型に基づく治療法の最適化も行われていない。本研究で LMNA 変異に特異的な治療法が開発できれば、循環器領域における precision medicine の先駆けとなることが期待できる。また、疾患特異的 iPSC 細胞を用いた疾患研究が臨床試験に結び付いた報告は循環器分野ではいまだに存在せず、本研究の実現は iPSC 創薬という、基礎研究と臨床を結び付ける新たな進歩となると考えられる。

【参考・引用文献】

1. Tobita, T., et al., *Genetic basis of cardiomyopathy and the genotypes involved in prognosis and left ventricular reverse remodeling*. 2018. **8**(1): p. 1998.
2. Ko, T., et al., *Quantification of DNA Damage in Heart Tissue as a Novel Prediction Tool for Therapeutic Prognosis of Patients With Dilated Cardiomyopathy*. *JACC Basic Transl Sci*, 2019. **4**(6): p. 670–680.
3. Higo, T., et al., *DNA single-strand break-induced DNA damage response causes heart failure*. *Nat Commun*, 2017. **8**: p. 15104.
4. Yamashita, A., et al., *Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes*. *Nature*, 2014. **513**(7519): p. 507–11.
5. Fujimori, K., et al., *Modeling sporadic ALS in iPSC-derived motor neurons identifies a potential therapeutic agent*. *Nat Med*. 2018. **24**(10): p. 1579–1589.