



Department of Cardiovascular Medicine
Osaka University Graduate School of Medicine

共同研機器セミナー

ゲノム解析・iPS細胞由来 分化心筋細胞を用いた心筋症研究

大阪大学大学院医学系研究科

循環器内科学

肥後 修一郎



CoMIT Omics Center受託サービス

次世代シーケンス解析

各種次世代シーケンサーを用いたハイスループットな塩基配列解析を行います。
解析の目的やデータ量に応じて最適な機種を選択していただく他、
特定の目的での解析サービスも提供しております。

▶ 各種プラットフォームを用いた解析

Ion PGM システム

遺伝子パネルの解析やPCR産物の変異解析に最適です。

▶ 詳細

MiSeq

遺伝子パネルの解析やPCR産物の変異解析に最適です。

▶ お問い合わせ

▶ ライブラリー調製からデータ解析までの一貫したサービス

エクソーム解析

血液、DNA検体から全エクソームを対象とした変異検出を行います。

▶ お問い合わせ

RNA-seq解析

RNA検体から転写産物の発現量比較解析を行います。

▶ お問い合わせ

▶ データ解析サポート

各種プラットフォームより得られたデータ解析のサポートを行います。
外注等により得られたデータも対象としております。

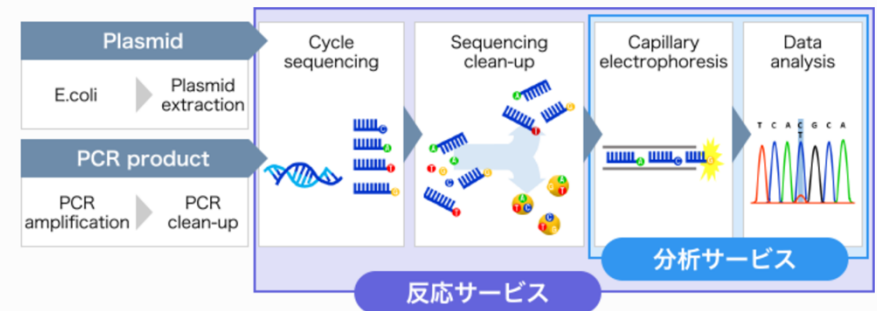
▶ お問い合わせ

サンガーシーケンス解析

分析サービス・反応サービス

サービス内容

本サービスはお任せいただく工程に応じて2つのサービスに区分されます。各サービスでご提出いただくものや方法が異なるためご注意ください。



サンガーシーケンス
分析サービス

サンガーシーケンス
反応サービス

受付キャンセル

心不全とは

高血圧

虚血

弁膜症

初回心不全

心不全再発
心不全増悪

重症心不全

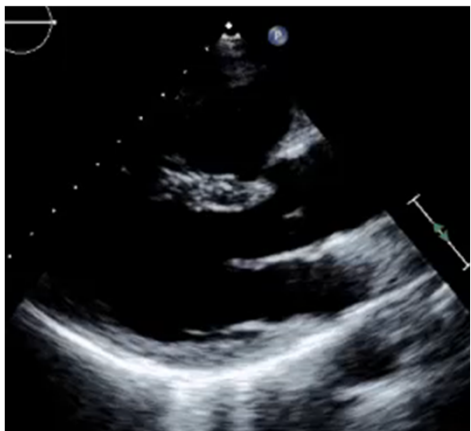
補助人工心臓
心臓移植

身体機能

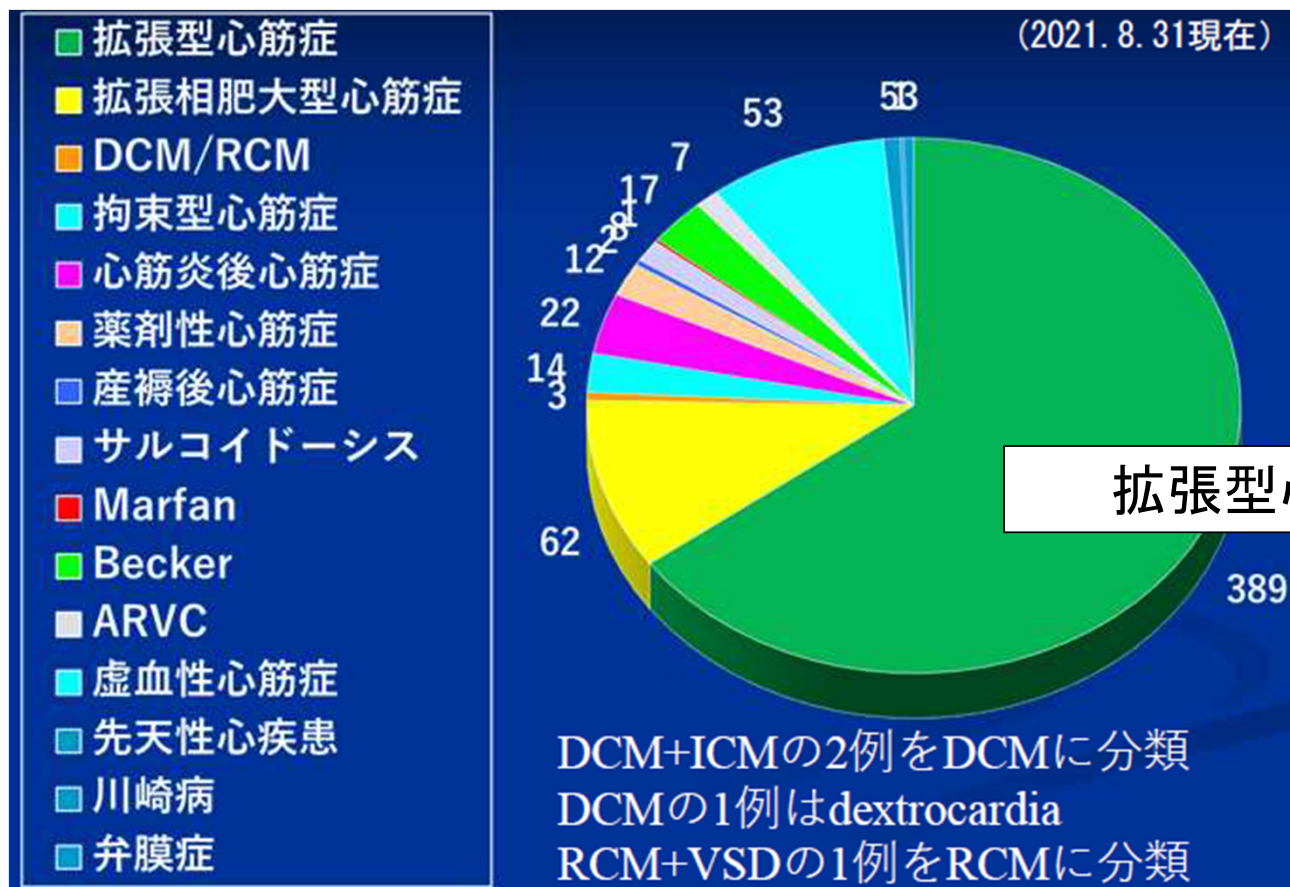
時間経過

883名

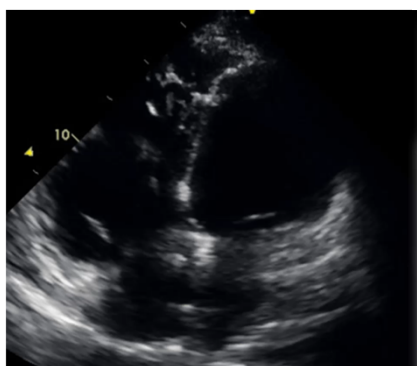
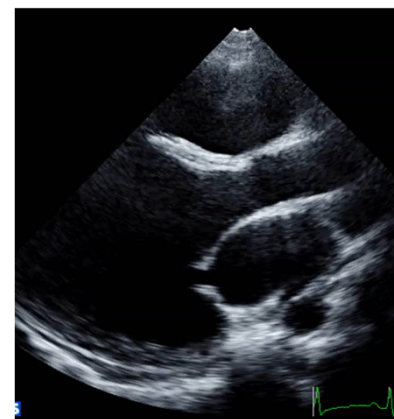
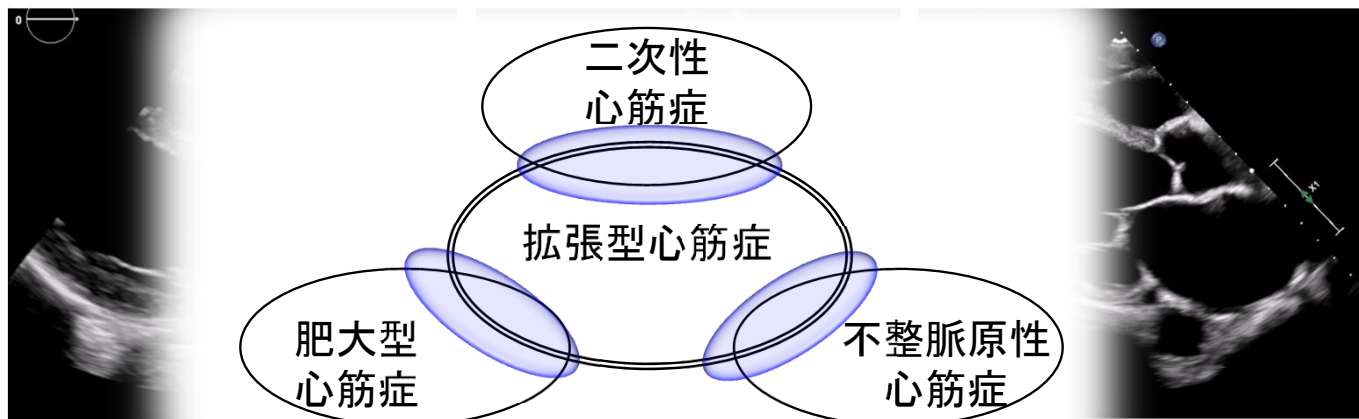
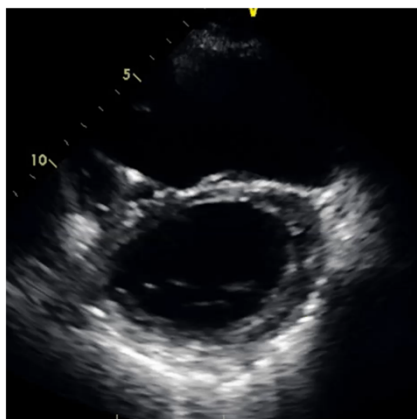
2023年7月



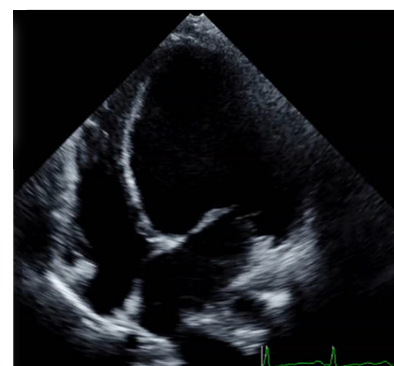
心臓移植患者の適応疾患



難治性心筋症による重症心不全は 循環器医療における最大のアンメットニーズである

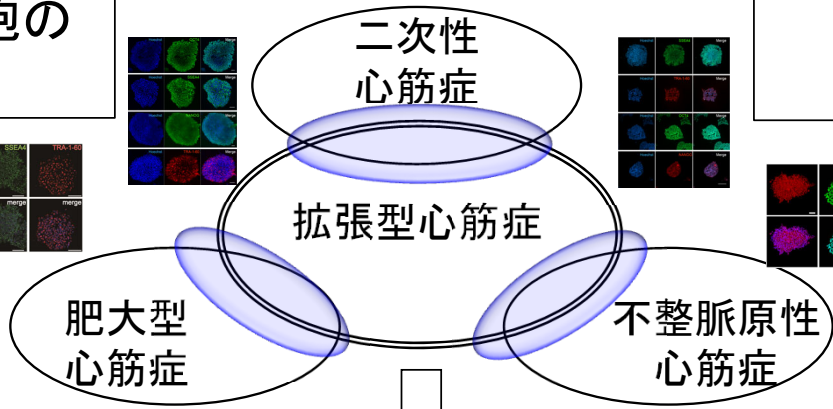


系統的な分類診断が困難である
心筋症の病態は依然明らかでない
疾患の治癒につながる治療法が存在しない

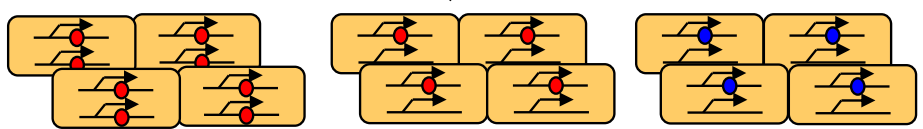


難治性心筋症ヒトモデル細胞の樹立と病態解明

難治性心筋症分子基盤を是正する治療法の開発



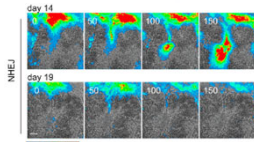
疾患iPS細胞の樹立と精密なアレル改変



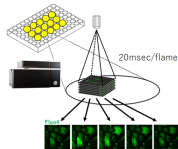
難治性心筋症ヒトモデル細胞を用いた機能解析

http://www.cardiology.med.osaka-u.ac.jp/?page_id=33635

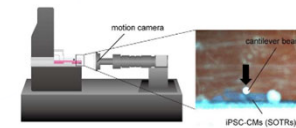
Motion Vector解析



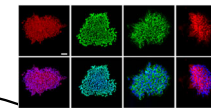
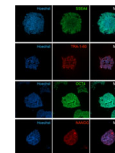
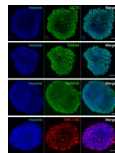
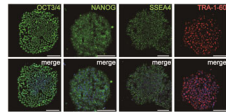
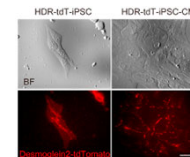
ハイコンテンツイメージング



マイクロスケール圧縮強度測定



ゲノム編集によるイメージング解析



COCでのAmplicon sequence panelの活用事例

両心不全を呈した拡張型心筋症

COCでのAmplicon sequence panelの活用事例

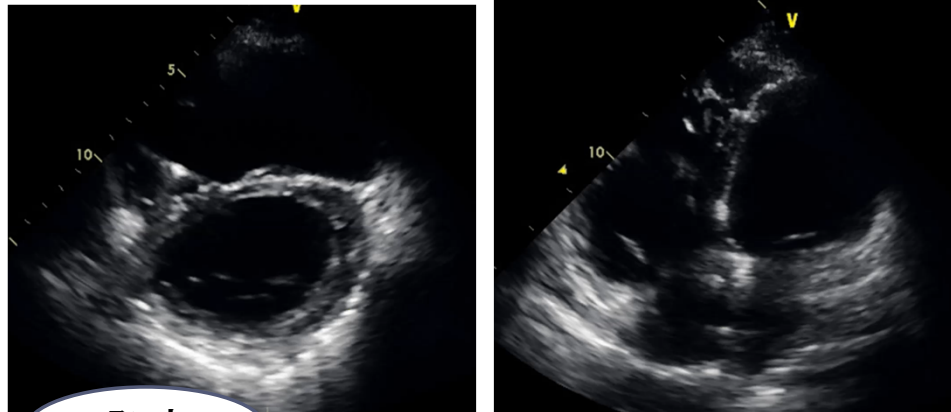
重症心不全を呈したBecker型筋ジストロフィー女性キャリアー

COCでのSingle cell RNA sequenceの活用事例

SARS-CoV-2スパイクタンパク質受容体結合ドメインが
ヒトiPS細胞由来分化心筋細胞に与える影響



若年発症拡張型心筋症・重症心不全



発症

15歳発症

LVDd/s: 61/54 mm

EF: 24%

β 遮断薬

ACE阻害薬

利尿薬

アルドステロン拮抗薬

CRT-D 植え込み術

LVAD 植え込み術

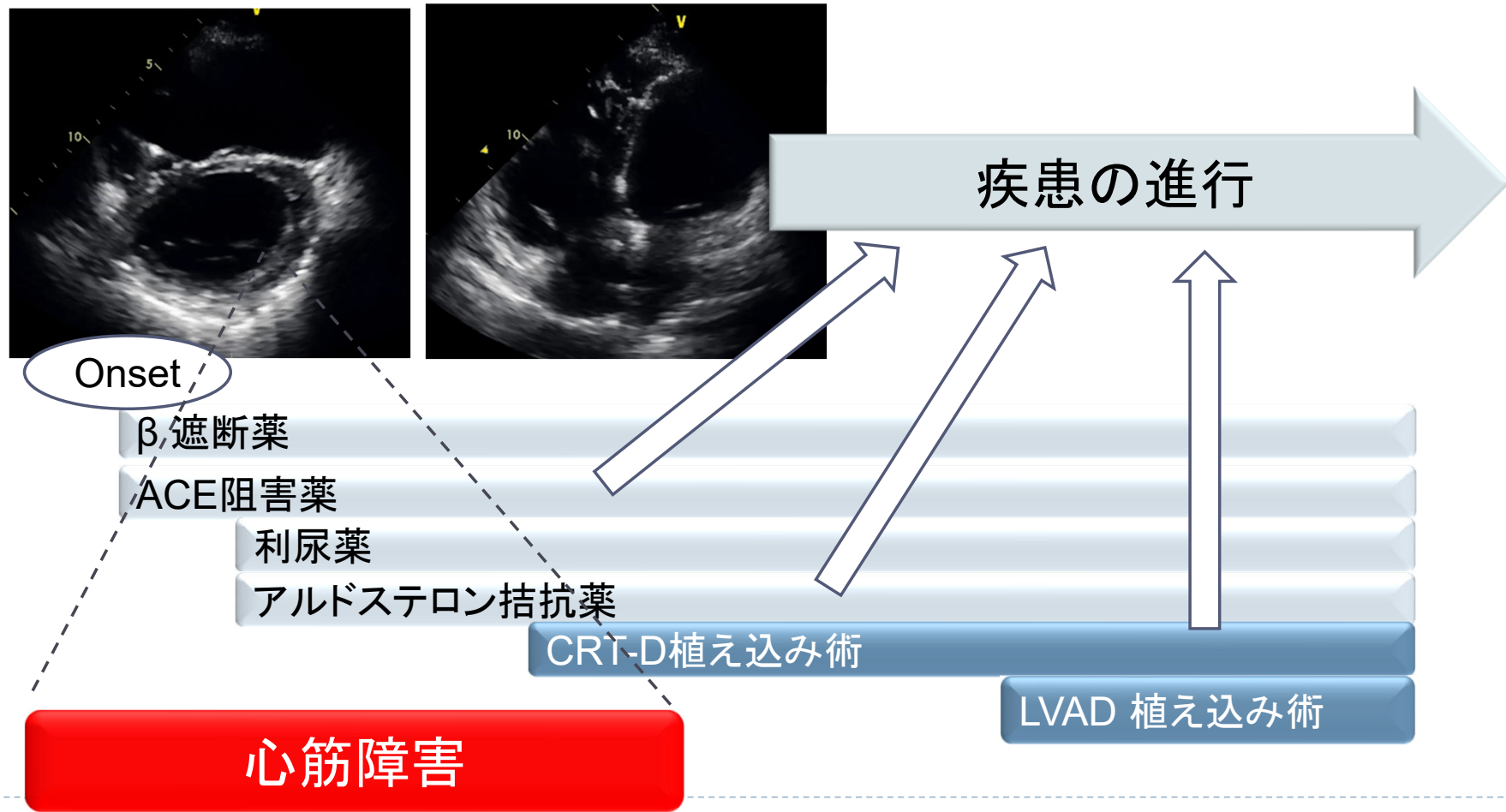
致死性
不整脈

15歳

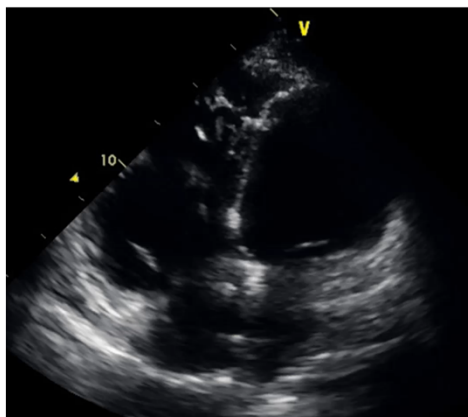
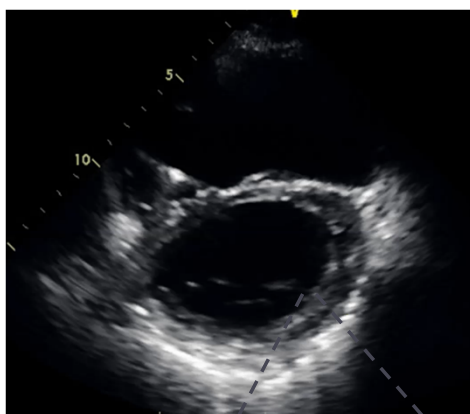
22歳

28歳

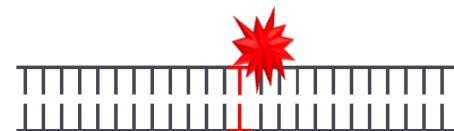
若年発症拡張型心筋症・重症心不全



心筋障害の原因としてのゲノム遺伝子異常



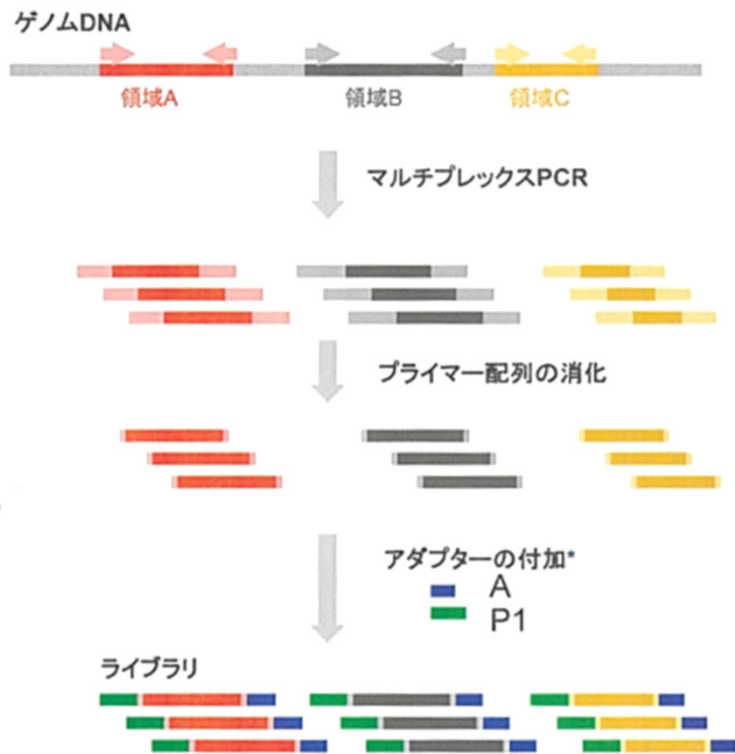
遺伝子バリエーション



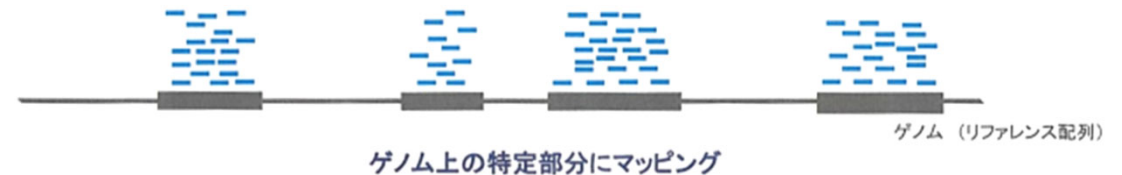
心筋障害

Ion Amplicon Sequenceの実施

404の遺伝性心血管原因遺伝子を対象としたパネルシーケンス解析



*複数ライブラリを1ランで読むためには
ライブラリにバーコードアダプタの付加が必要



Cardiovascular Research Panel

Ion AmpliSeq™ Cardiovascular Research Panel	Inherited Disease	Human (hg19)	Pool1: 5222 amplicons Pool2: 5208 amplicons (2 tubes)	<input checked="" type="checkbox"/> DNA <input type="checkbox"/> Community Panel <input checked="" type="checkbox"/> Trial Kit Available <input type="checkbox"/> Standard	<input type="button" value="Review panel"/> <input checked="" type="button" value="Sign in to order"/>
---	----------------------	-----------------	---	---	---

心疾患に関連する404の遺伝子のCDSのみを増幅

病原性遺伝子変異の絞り込み

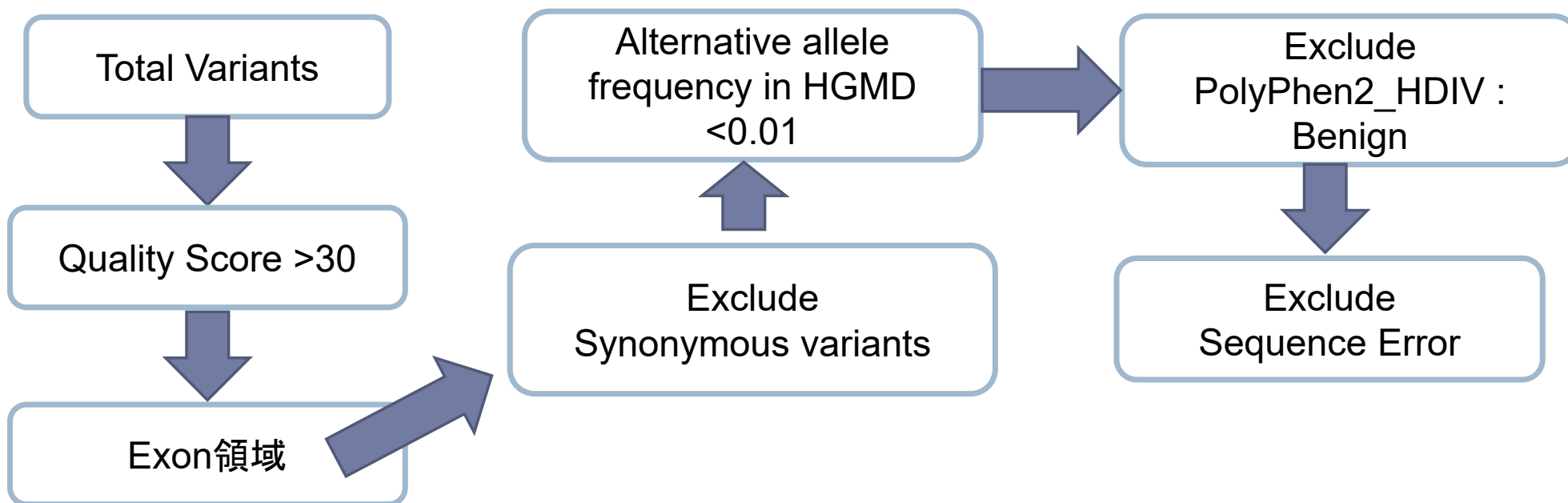
Variant

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
1	Chr	Start	End	Ref	Alt	Func. re	Gene re	GeneD	Exonicf	AAChar	Func. kr	Gene. kt	GeneD	Exonicf	AAChar	Func. et
456	chr2	73677846	73677846	G	A	exonic	ALMS1	.	nonsynony	ALMS1.N	exonic	ALMS1	.	nonsynony	ALMS1.uc	exonic
463	chr2	73747095	73747095	G	A	exonic	ALMS1	.	nonsynony	ALMS1.N	exonic	ALMS1	.	nonsynony	ALMS1.uc	exonic
610	chr19	13470519	13470519	C	-	exonic	CACNA1A	.	frameshift	CACNA1A	exonic	CACNA1A	.	frameshift	CACNA1A	exonic
692	chr13	1.11E+08	1.11E+08	G	A	exonic	COL4A1	.	nonsynony	COL4A1.N	exonic	COL4A1	.	nonsynony	COL4A1.u	exonic
814	chr6	43014298	43014299	TT	CC	exonic	CUL7	.	nonframes	CUL7.NM	exonic	CUL7	.	nonframes	CUL7.uc0	exonic
926	chr6	56426272	56426272	T	C	exonic	DST	.	nonsynony	DST.NM	exonic	DST	.	nonsynony	DST.uc00	exonic
956	chr11	65638024	65638024	-	C	exonic	EFEMP2	.	frameshift	EFEMP2	exonic	EFEMP2	.	frameshift	EFEMP2.u	exonic
963	chr11	65638024	65638024	A	T	exonic	EFEMP2	.	nonsynony	EFEMP2	exonic	EFEMP2	.	nonsynony	EFEMP2.u	exonic
1014	chr9	1.41E+08	1.41E+08	G	-	exonic	EHMT1	.	frameshift	EHMT1.N	exonic	EHMT1	.	frameshift	EHMT1.uc	exonic

データベース情報

V	W	X	Y	Z	AA	AB	AC	AD	AE	AF
generic	esp650	1000g2	snp138	snp135	clinvar	ExAC_A	ExAC_A	ExAC_A	ExAC_E	ExAC_F
0.002494	.	0.0002	rs2004328	.	.	0.0001	0	0	0.0016	0
0.003333	1.65E-05	0	0	0.0002	0
0.003633	.	.	rs1997064	.	.	6.63E-05	0	0	0.0009	0

...



迅速、安価、ドライ解析が不要、データ解釈が簡便

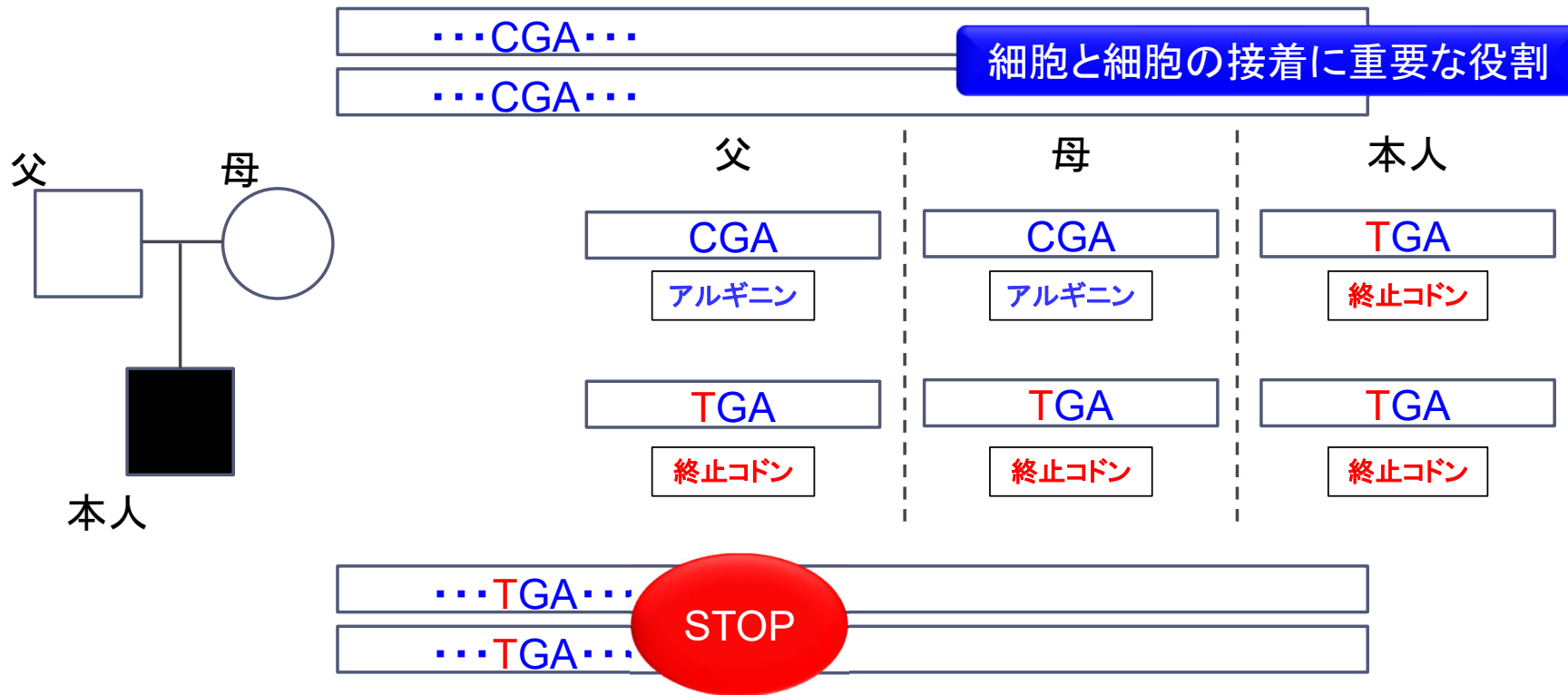
Ion Amplicon Sequenceの実施

404の遺伝性心血管原因遺伝子を対象としたパネルシーケンス解析

A2M	CACNA1D	DMD	GAA	KANSL1	MYH11	PSEN2	SOS1	ZEB2
ABCC9	CACNB2	DNAJB6	GALNT3	KCNA5	MYH6	PTPNI1	SOX18	ZFPM2
ACAD9	CACNB2	DNAJC19	GATA2	KCNE1	MYH7	RAB3GAP2	SRCAP	ZIC3
ACADVL	CALM1	DOCK6	GATA3	KCNE2	MYH9	RASA1	SRD5A3	ZMPSTE24
ACTA2	CALR3	DOLK	GATA4	KCNE3	MYL2	RBM10	STOX1	
ACTC1	CASQ2	DSC2	GATA6	KCNH2	MYL3	RBM20	STRA6	
ACTN2	CAVI	DSC3	GATA6	KCNJ1	MYLK2	RBM8A	SYNE2	
ACVR1	CAV3	DSG2	GATAD1	KCNJ2	MYLK	RYR2	TAB2	
ACVR2B	CCM2	DSP	GBE1	KCNJ5	MYOZ2	SCN1B	TAZ	
ACVRL1	CEP290	DST	GDF1	KCNJ5	MYPN	SCN3B	TBC1D24	
ADCK3	CETP	DTNA	GJA1	KCNMB1	NAA10	SCN4A	TBX1	
ADRB1	CFC1	DYSF	GJA5	KCNQ1	NAGA	SCN4B	TBX20	
AGK	CFH	EDNRB	GJC2	KIF11	NBEAL2	SCN5A	TBX5	
AGTR1	CFH	EFEMP2	GLA	KL	NEXN	SCN9A	TCAP	
AGT	CHD7	EHMT1	GNB3	KRAS	NKX2-5	SCO2	TGFB2	
AGXT	CHKB	ELN	GNPTAB	KRIT1	NKX2-6	SDHAF1	TGFB3	
AKAP10	CHRNA1	EMD	GPC3	LAMA2	NODAL	SDHA	TGFB3	
AKT3	CHRND	ENG	GPD1L	LAMA4	NOTCH1	SDHB	TGFBR1	
ALMS1	CLCNKB	ENPP1	GSN	LAMP2	NOTCH3	SDHC	TGFBR2	
ANK2	CLIC2	EPOR	GUSB	LDB3	NPHS1	SDHD	TLL1	
APOA1	COL3A1	ESCO2	GYG1	LDLR	NPPA	SEC23A	TMEM43	
APOB	COL4A1	EXT1	GYPA	LEFTY2	PCCA	SEMA3E	TMEM70	
APP	COL4A3	F2	HADHA	LMNA	PCCB	SEPN1	TMPO	
ARL6	COL4A5	F5	HAND2	LPAR6	PER2	SERPINA3	TNNC1	
ATP1A2	COL5A1	FBLN5	HCCS	LPA	PGAP3	SGCA	TNNI3	
ATP7A	COL5A2	FBN1	HCN4	LPL	PGM1	SGCB	TNNT2	
AUH	COL7A1	FBN2	HCRT	LRPPRC	PGM1	SGCD	TNXB	
BAG3	CPOX	FGA	HFE2	MAP2K1	PIK3CA	SHANK3	TPM1	
BANF1	CPT2	FGF10	HOXA1	MAP2K2	PKD1	SKI	TPM3	
BBS10	CR2	FGF23	HPGD	MBD5	PKD2	SLC12A3	TREX1	
BBS1	CREBBP	FGFR2	HRAS	MED12	PKP2	SLC19A2	TRIM32	
BBS2	CRELD1	FGFR3	HSD11B2	MEF2A	PLN	SLC22A5	TSC1	
BBS4	CRYAB	FHL1	HTRA1	MEF2C	PLOD1	SLC25A20	TSC2	
BBS5	CSF1R	FKRP	RYR1	MIB1	PLOD3	SLC25A4	TTC8	
BBS7	CSRP3	FKTN	IKBKAP	MKKS	PMM2	SLC2A10	TTN	
BBS9	CST3	FLNA	IKBKG	MKS1	POLG	SLC52A2	TTR	
BRAF	CUL7	FLT4	ISCU	MRPL44	PPOX	SLC6A2	VCL	
C10orf2	CYP11B1	FOXC2	JAG1	MRPS22	PRKAG2	SMAD3	VHL	
CACNA1A	CYP27A1	FOXF1	JAM3	MTHFR	PRKAR1A	SMAD4	WDPCP	
CACNA1C	DAG1	FXN	JPH2	MTO1	PRKCH	SNTA1	XPNPEP3	
	DES		JUP	MYBPC3	PSENI		XYLT1	
	DGKE							

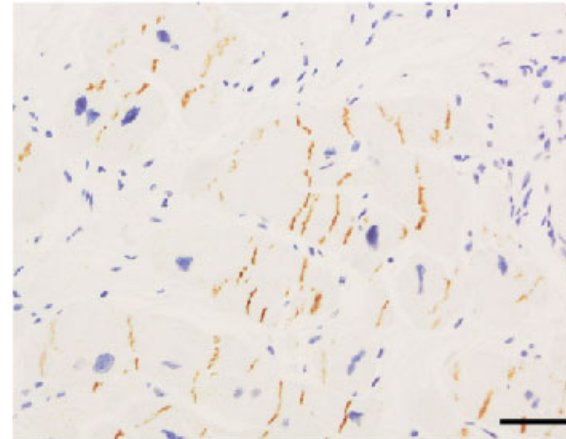
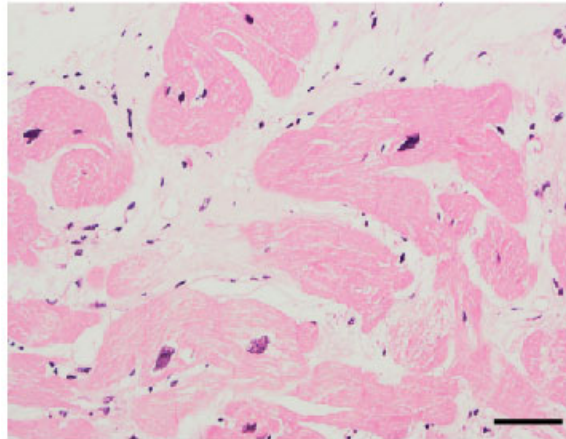
拡張型心筋症に対する遺伝学的検査

DSG2 (デスモグレイン2)

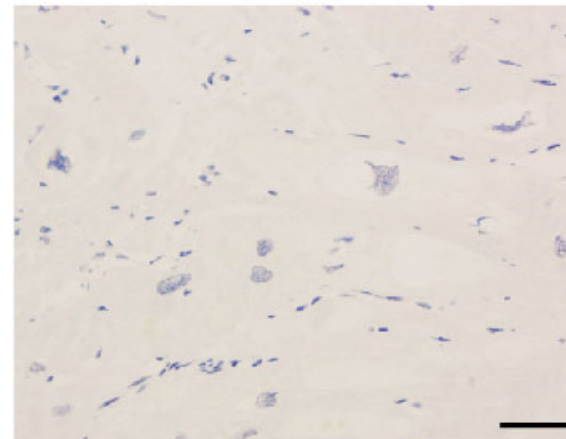
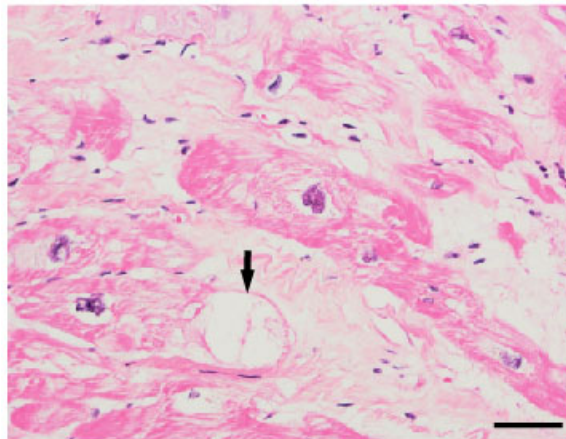


心筋組織におけるデスモグレイン2の完全欠損

コントロール
拡張型心筋症

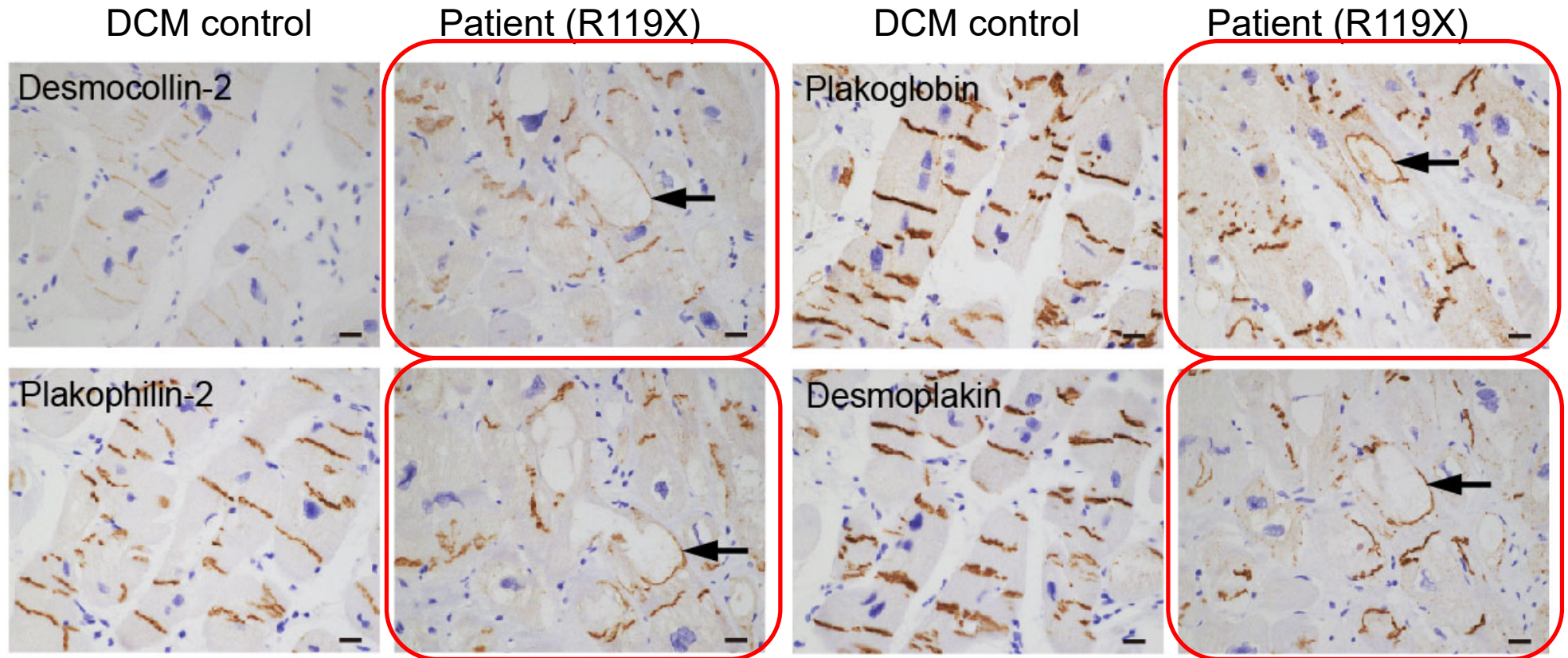


本症例



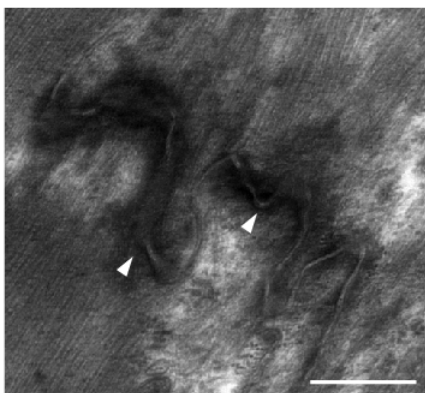
Scale bar: 50 μ m

デスモゾーム蛋白質の異常局在・空胞内沈着

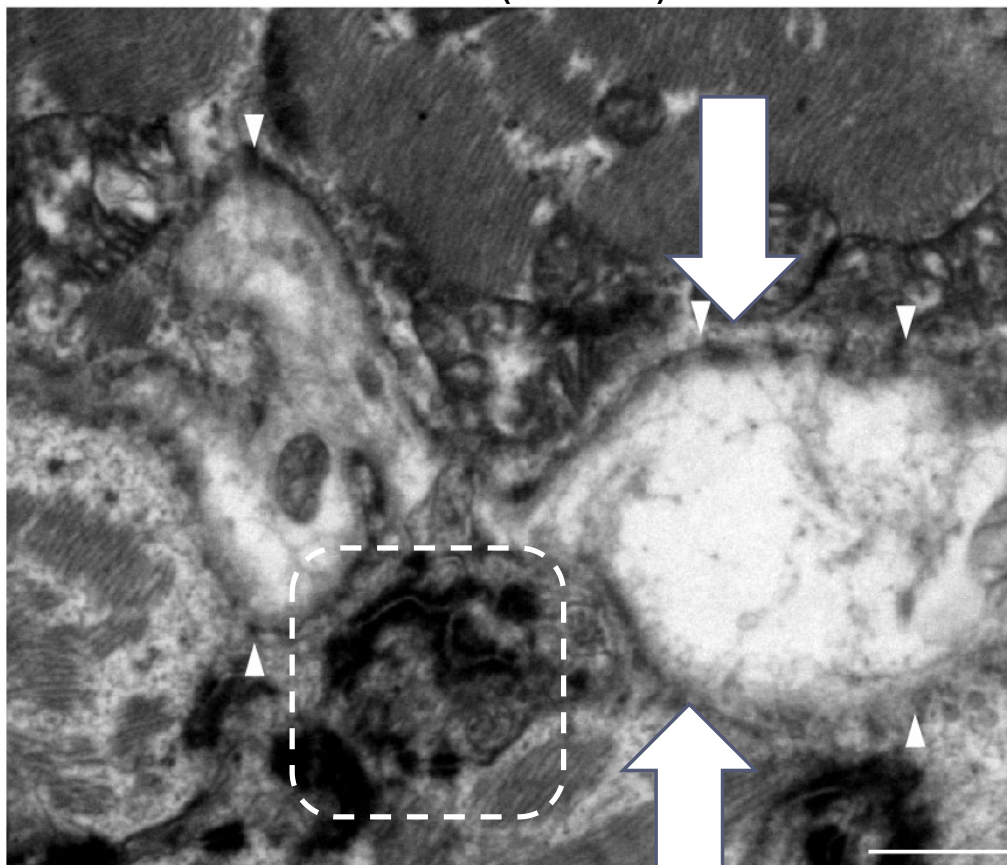


介在板の離開・断片化デスモゾームの異常集積

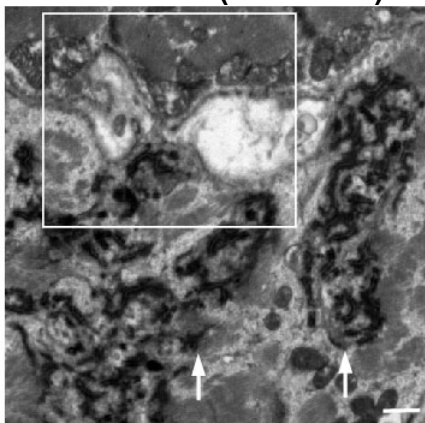
DCM control



Patient (R119X)

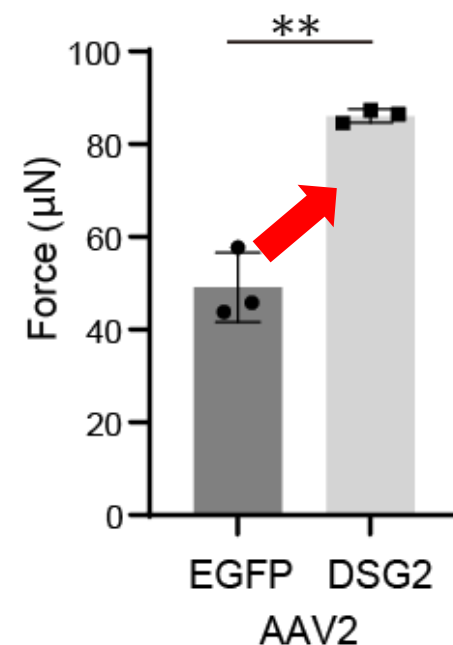
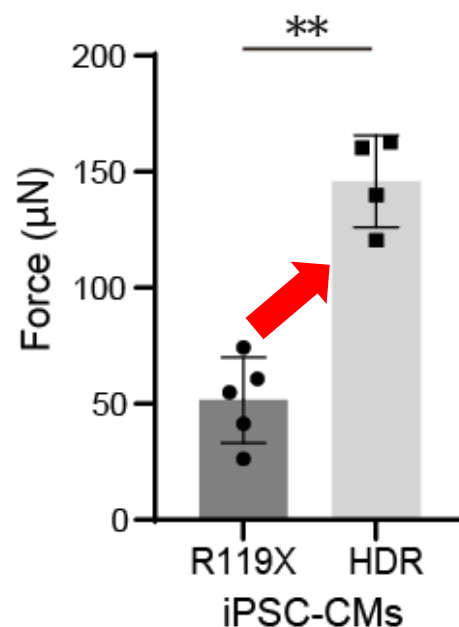
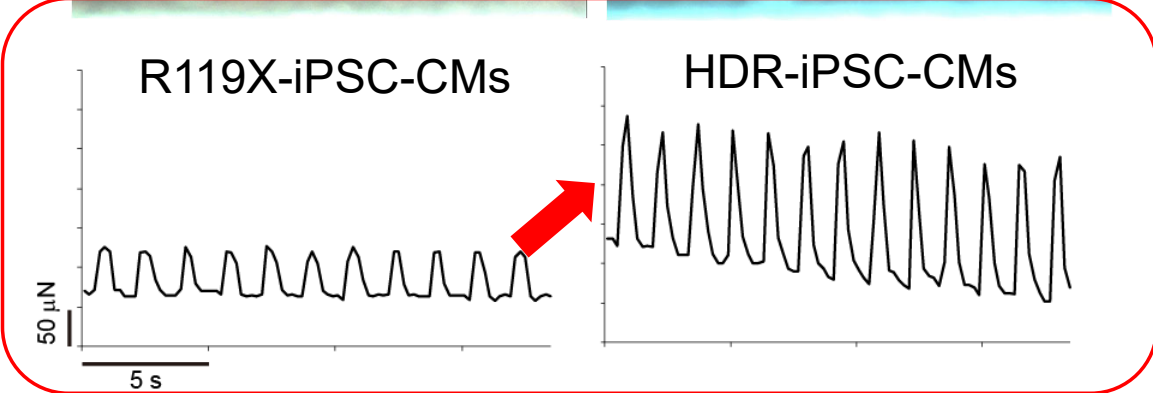
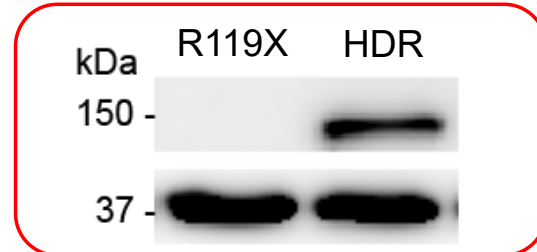
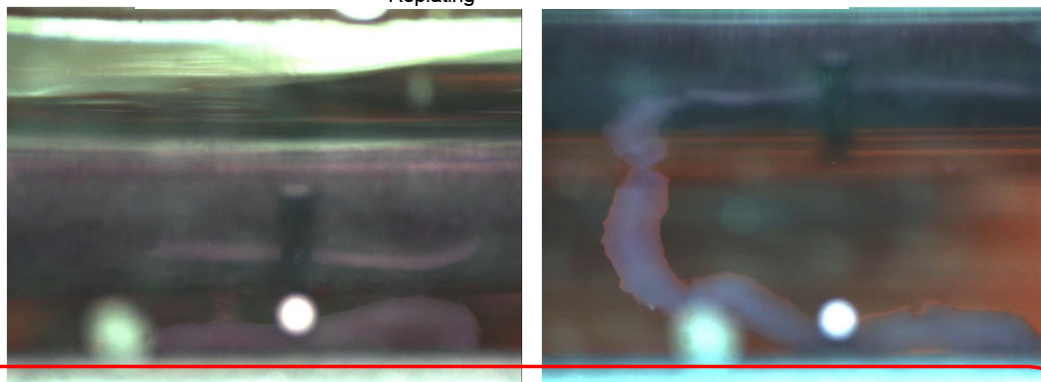
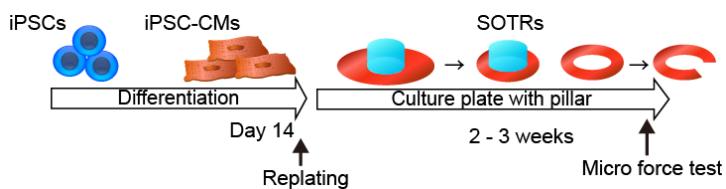


Patient (R119X)



Scale bar: 1 μ m

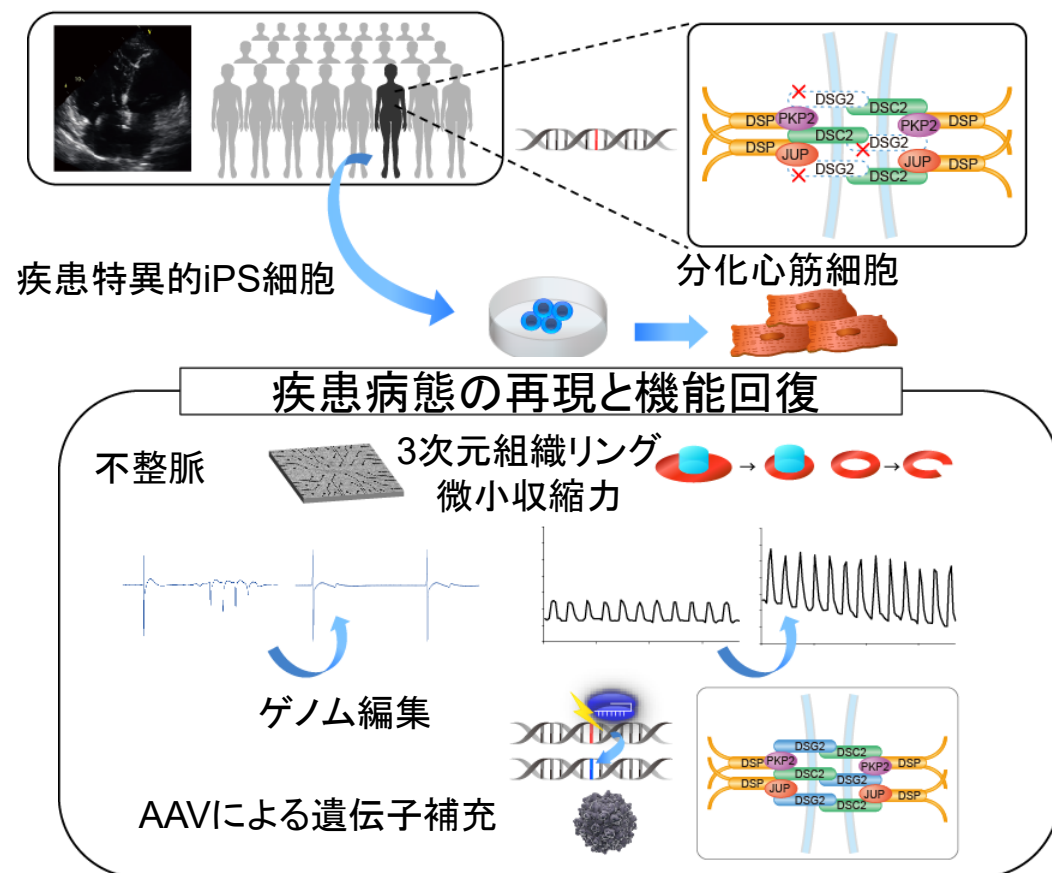
デスモグレイン2発現の回復により 三次元自己組織化リングにおける収縮力が改善する



重症両心不全を呈した拡張型心筋症

特発性拡張型心筋症

デスモグレイン2欠損心筋症



□ 重症心不全に移行した拡張型心筋症において、ゲノム解析、心筋病理解析を行い、ホモ接合型ナンセンス変異によるデスモグレイン2欠損心筋症を見出した。

□ 疾患iPS分化心筋細胞を用いて、疾患病態の再現と、ゲノム編集やAAV遺伝子補充による機能回復を実証した。

デスマグレイン2 R119Xバリエーション

Database	European	African	East Asian	South Asian	American	Finnish	Other	Total
ExAC	0.00001528	0	0.00023496	0	0	0	0	0.00002524
	1 / 65454	0 / 9638	2 / 8512	0 / 16378	0 / 11394	0 / 6568	0 / 892	3 / 118836
ESP	0	0						0
	0 / 8600	0 / 4400						0 / 13000
1KG	0	0	0	0	0	0	0	0
	0 / 1006	0 / 1322	0 / 1008	0 / 978	0 / 694	0 / 198		0 / 5008

Nature. 2016 Aug 18;536(7616):285-91.
Nature. 2015 Oct 1;526(7571):68-74.
Science. 2012 Jul 6;337(6090):64-9.
Nature. 2013 Jan 10;493(7431):216-20.
PLoS One. 2014 Jun 23;9(6):e100924.
J Hum Genet. 2016 Jun;61(6):547-53.



COCでのAmplicon sequence panelの活用事例

両心不全を呈した拡張型心筋症

COCでのAmplicon sequence panelの活用事例

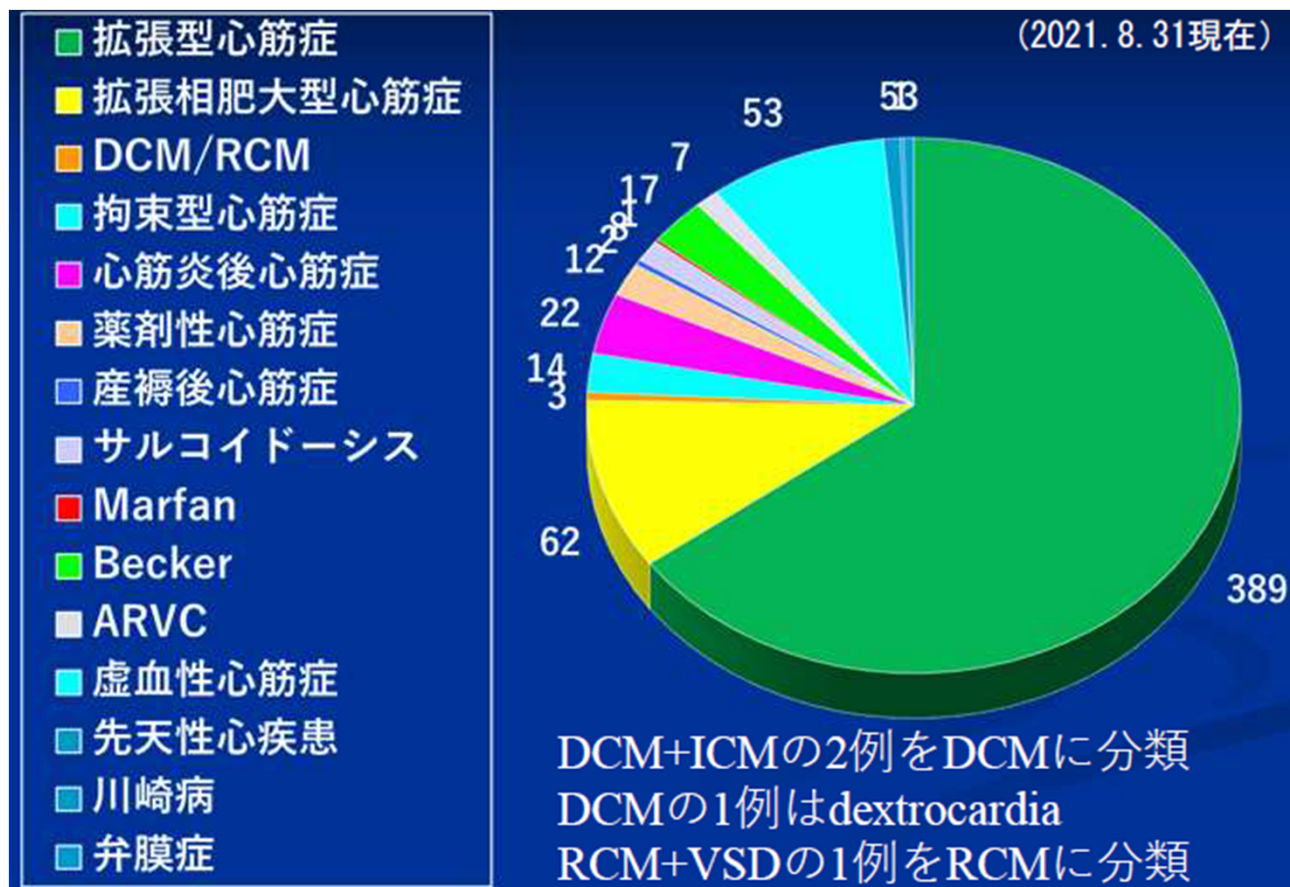
重症心不全を呈したBecker型筋ジストロフィー女性キャリアー

COCでのSingle cell RNA sequenceの活用事例

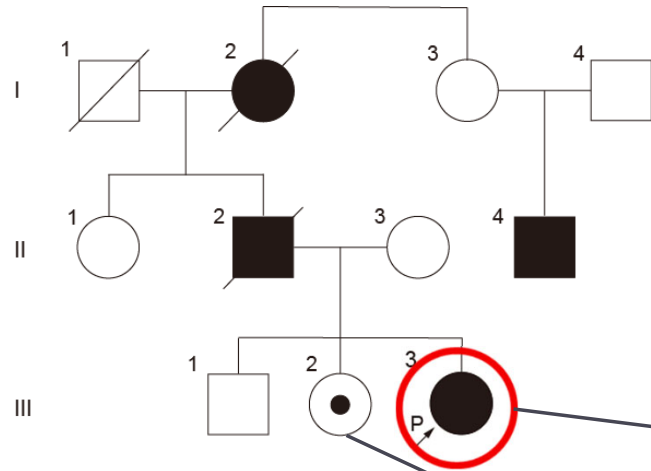
SARS-CoV-2スパイクタンパク質受容体結合ドメインが
ヒトiPS細胞由来分化心筋細胞に与える影響



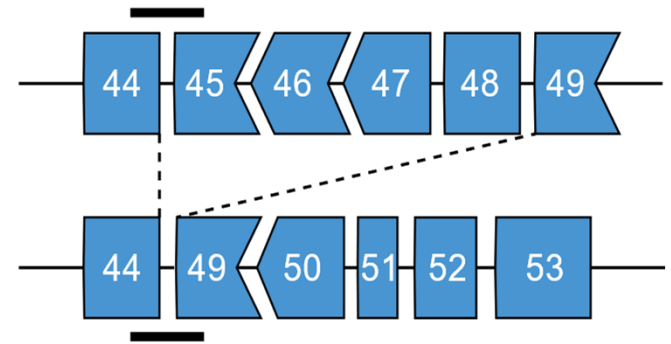
心臓移植患者の適応疾患



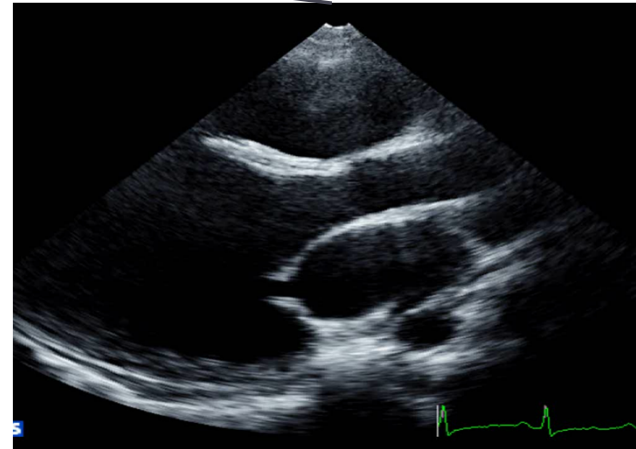
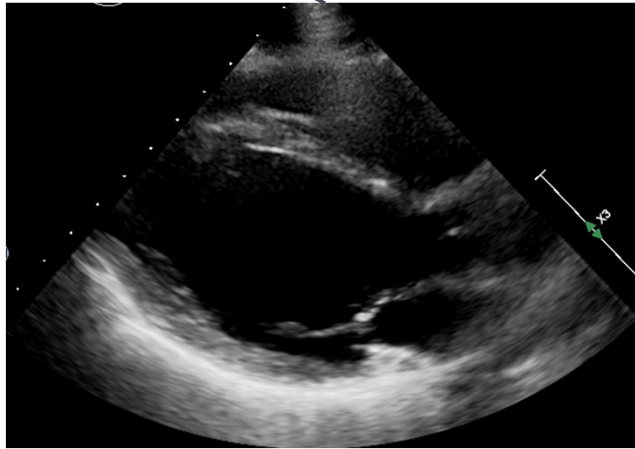
重症心不全を呈したBecker型筋ジストロフィー女性キャリアー



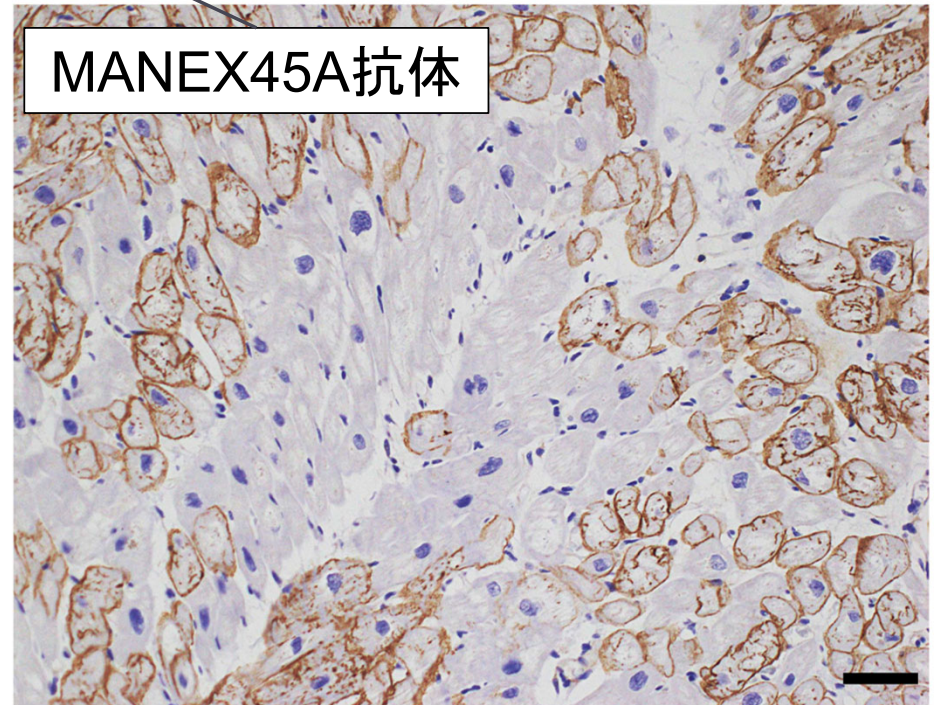
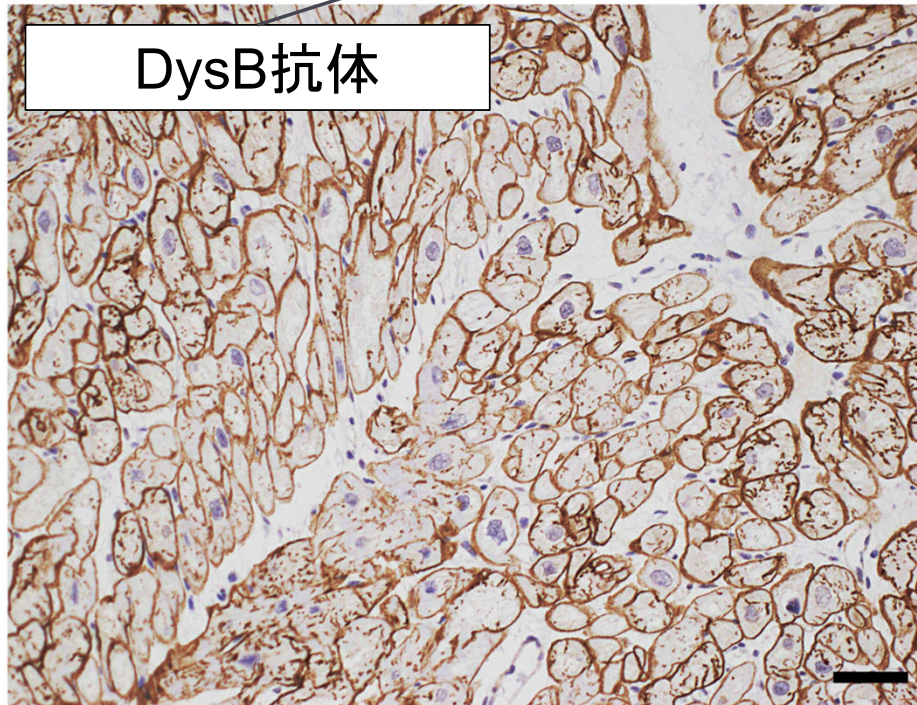
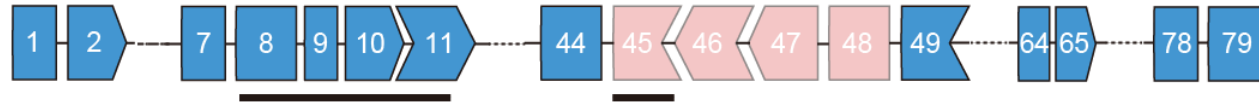
WT *DMD*



Δ 45-48 *DMD*



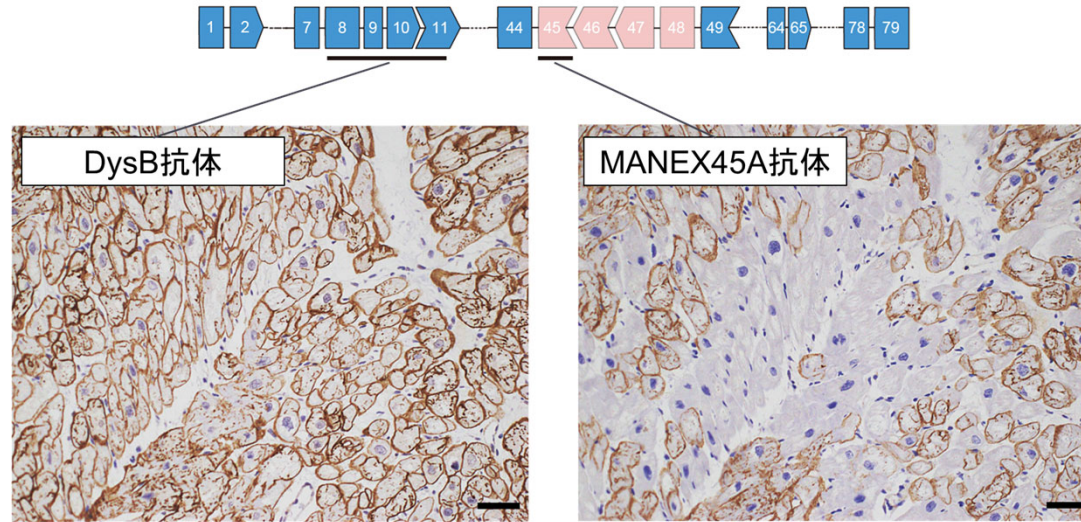
発端者心筋組織におけるジストロフィンタンパク質発現



Scale bars : 50 μ m

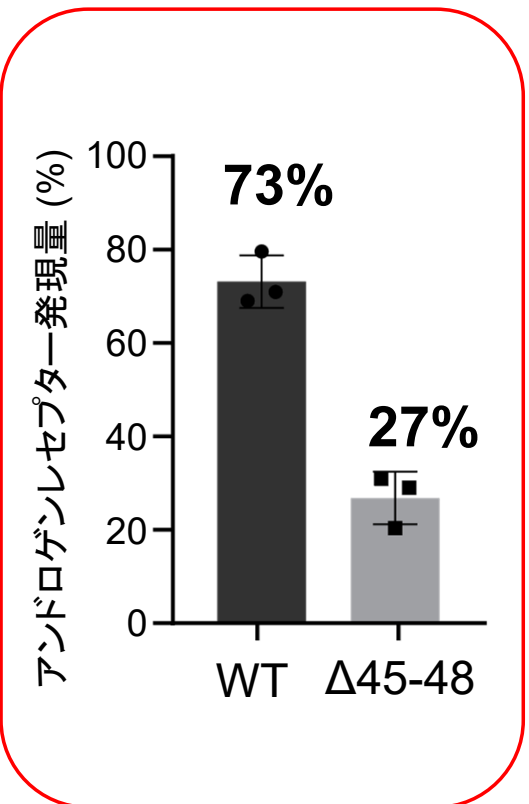
WT : Δ 45-48 \cong 60% : 40%

なぜ発端者のみが重症心不全を発症したか？



心臓における野生型、変異型ジストロフィンの
発現比率が姉妹で異なっていたのではないか？

姉の末梢血ゲノムDNA



共同研でのMultina解析を利用

Ion Amplicon Sequenceの実施

404の遺伝性心血管原因遺伝子を対象としたパネルシーケンス解析

A2M	CACNA1D	DMD	GAA	KANSL1	MYH11	PSEN2	SOS1	ZEB2
ABCC9	CACNB2	DNAJB6	GALNT3	KCNA5	MYH6	PTPNI1	SOX18	ZFPM2
ACAD9	CACNB2	DNAJC19	GATA2	KCNE1	MYH7	RAB3GAP2	SRCAP	ZIC3
ACADVL	CALM1	DOCK6	GATA3	KCNE2	MYH9	RASA1	SRD5A3	ZMPSTE24
ACTA2	CALR3	DOLK	GATA4	KCNE3	MYL2	RBM10	STOX1	
ACTC1	CASQ2	DSC2	GATA6	KCNH2	MYL3	RBM20	STRA6	
ACTN2	CAVI	DSC3	GATA4	KCNJ1	MYLK2	RBM8A	SYNE2	
ACVR1	CAV3	DSG2	GBE1	KCNJ2	MYLK	RYR2	TAB2	
ACVR2B	CCM2	DSP	GDF1	KCNJ5	MYOZ2	SCN1B	TAZ	
ACVRL1	CEP290	DST	GJA1	KCNMB1	MYPN	SCN3B	TBC1D24	
ADCK3	CETP	DTNA	GJA5	KCNQ1	NAA10	SCN4A	TBX1	
ADRB1	CFC1	DYSF	GJC2	KIF11	NAGA	SCN4B	TBX20	
AGK	CFH	EDNRB	GLA	KL	NBEAL2	SCN5A	TBX5	
AGTR1	CHD7	EFEMP2	GNB3	KRAS	NEXN	SCN9A	TCAP	
AGT	CHKB	EHMT1	GNPTAB	KRIT1	NKX2-5	SCO2	TGFB2	
AGXT	CHRNA1	ELN	GPC3	LAMA2	NKX2-6	SDHAF1	TGFB3	
AKAP10	CHRNA1	EMD	GPC3	LAMA2	NODAL	SDHA	TGFB3	
AKT3	CHRNA1	ENG	GPC3	LAMA2	NOTCH1	SDHB	TGFB3	
ALMS1	CHRNA1	ENG	GPC3	LAMA2	NOTCH1	SDHC	TGFB3	
ANK2	CLCNKB	ENPP1	GPC3	LAMA2	NOTCH3	SDHD	TLL1	
APOA1	CLIC2	EPOR	GUSB	LDB3	NPHS1	SEC23A	TMEM43	
APOB	COL3A1	ESCO2	GYG1	LDLR	NPPA	SEMA3E	TMEM70	
APP	COL4A1	EXT1	GYPA	LEFTY2	PCCA	SEPN1	TMPO	
ARL6	COL4A3	F2	HADHA	LMNA	PCCB	SERPINA3	TNNC1	
ATP1A2	COL4A5	F5	HAND2	LPAR6	PER2	SGCA	TNNC1	
ATP7A	COL5A1	FBLN5	HCCS	LPA	PGAP3	SGCB	TNNI3	
AUH	COL5A2	FBN1	HCN4	LPL	PGM1	SGCD	TNNT2	
BAG3	COL7A1	FBN2	HCRT	LRPPRC	PGM1	SHANK3	TNNT2	
BANF1	CPOX	FGA	HFE2	MAP2K1	PIK3CA	SKI	TPM1	
BBS10	CPT2	FGF10	HOXA1	MAP2K2	PKD1	SLC12A3	TPM3	
BBS1	CR2	FGF23	HPGD	MBD5	PKD2	SLC19A2	TREX1	
BBS2	CREBBP	FGFR2	HRAS	MED12	PKP2	SLC22A5	TRIM32	
BBS4	CRELD1	FGFR3	HSD11B2	MEF2A	PLN	SLC25A20	TSC1	
BBS5	CRYAB	FHL1	HTRA1	MEF2C	PLOD1	SLC25A20	TSC2	
BBS7	CSF1R	FKRP	RYR1	MIB1	PLOD3	SLC25A4	TTC8	
BBS9	CSRP3	FKRP	RYR1	MIB1	PLOD3	SLC25A4	TTC8	
BRAF	CST3	FKTN	IKBKAP	MKKS	PLN	SLC2A10	TTN	
C10orf2	CUL7	FLNA	IKBKAP	MKKS	POLG	SLC52A2	TTR	
CACNA1A	CYP11B1	FLT4	ISCU	MKS1	PPOX	SLC6A2	VCL	
CACNA1C	CYP27A1	FOXC2	ISCU	MRPL44	PRKAG2	SMAD3	VHL	
	DAG1	FOXF1	JAM3	MRPS22	PRKAR1A	SMAD4	WDPCP	
	DES	FXN	JPH2	MTHFR	PRKCH	SNTA1	XPNPEP3	
	DGKE		JUP	MYBPC3	PSENI		XYLT1	

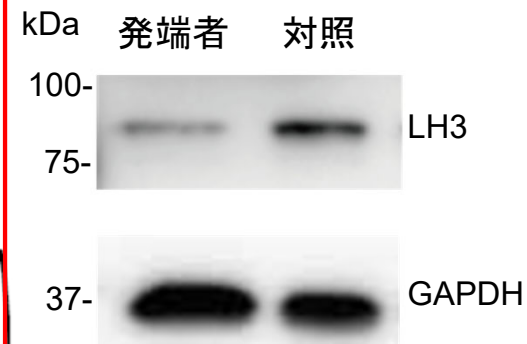
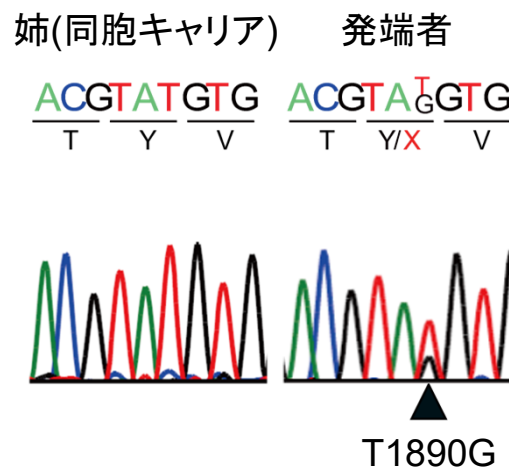
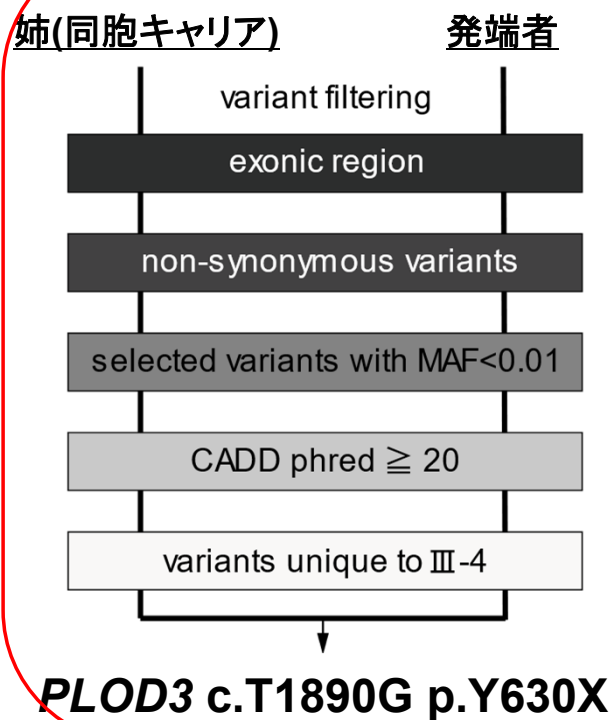


発端者においてヘテロ接合型 *PLOD3* ストップゲイン変異の同定

パネル解析

サンガーシーケンス

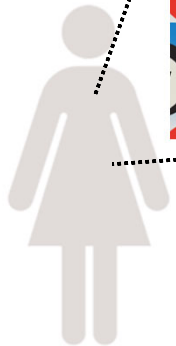
左室心筋を用いた
蛋白発現量評価



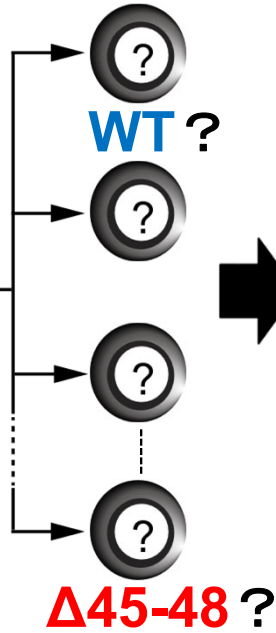
Becker型筋ジストロフィー女性キャリアからの アイソジェニックiPS細胞樹立

クローンの選択

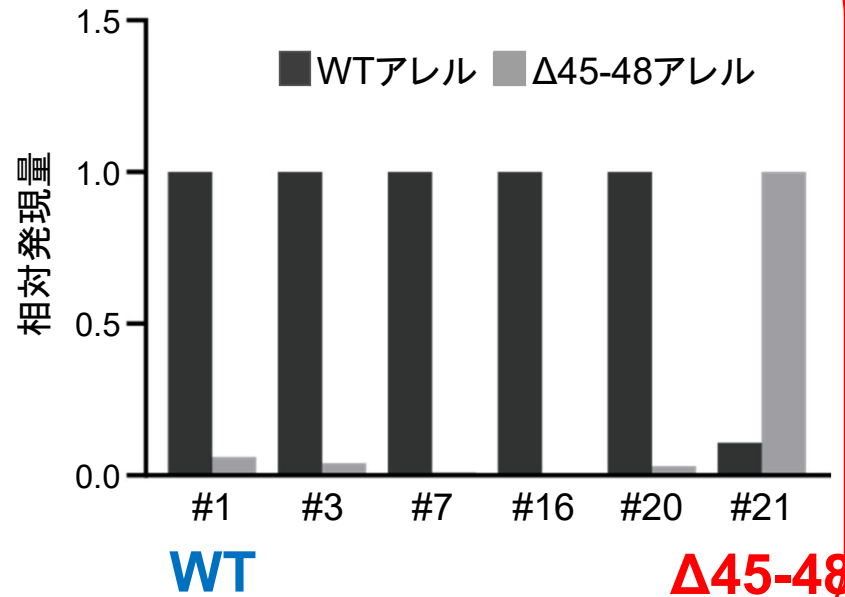
体細胞(末梢血)



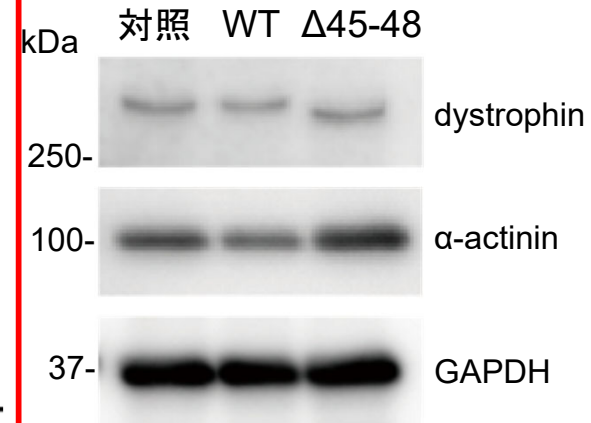
発端者



各クローンのddPCR解析

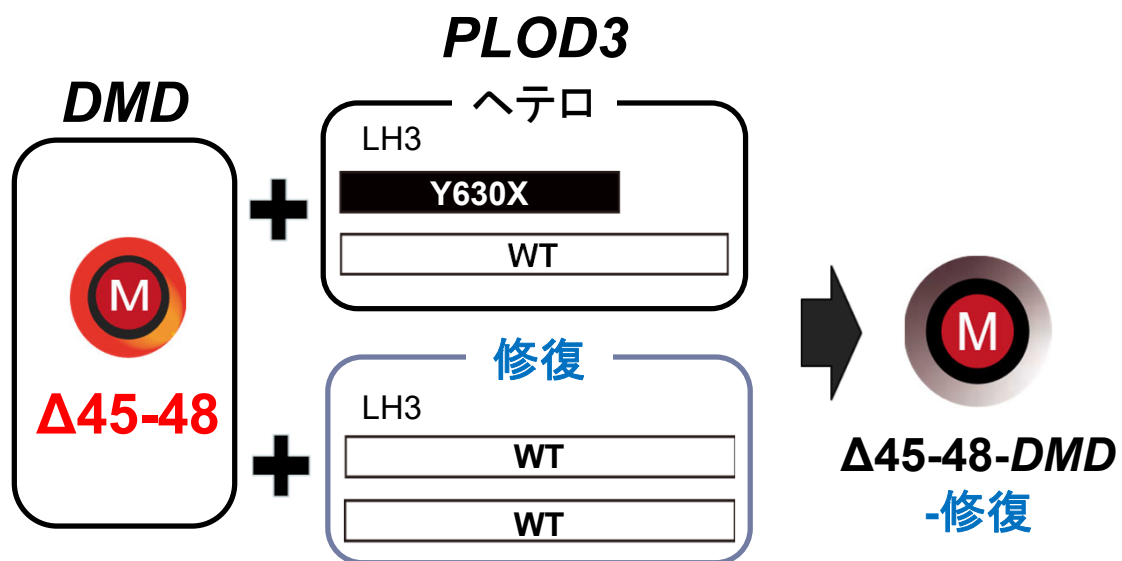


iPS細胞由来 分化心筋細胞

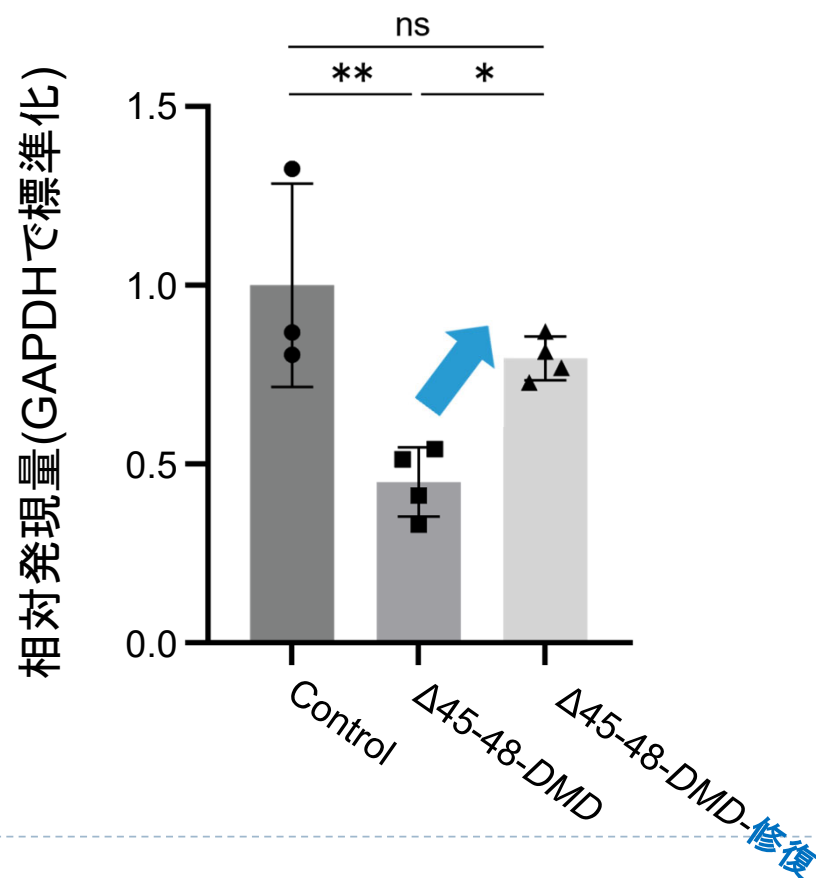


PLOD3 Y630X変異を修復したアイソジェニックiPS細胞の作成

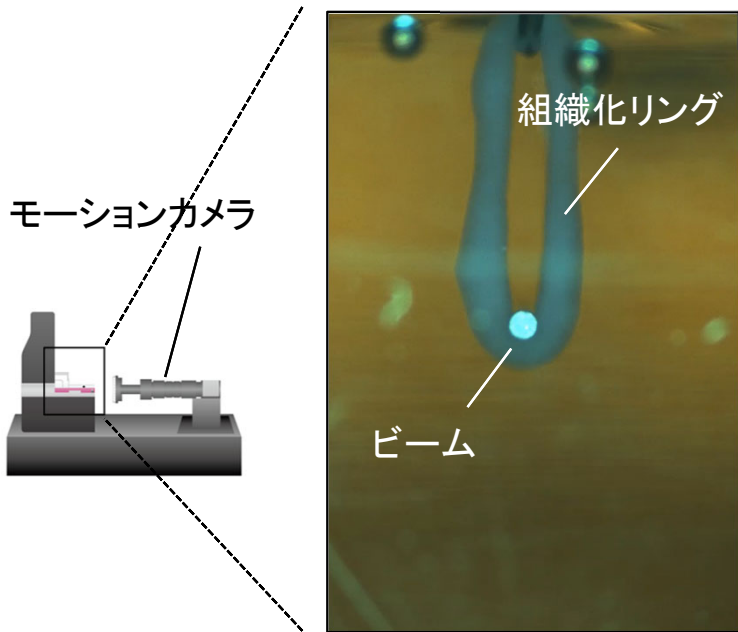
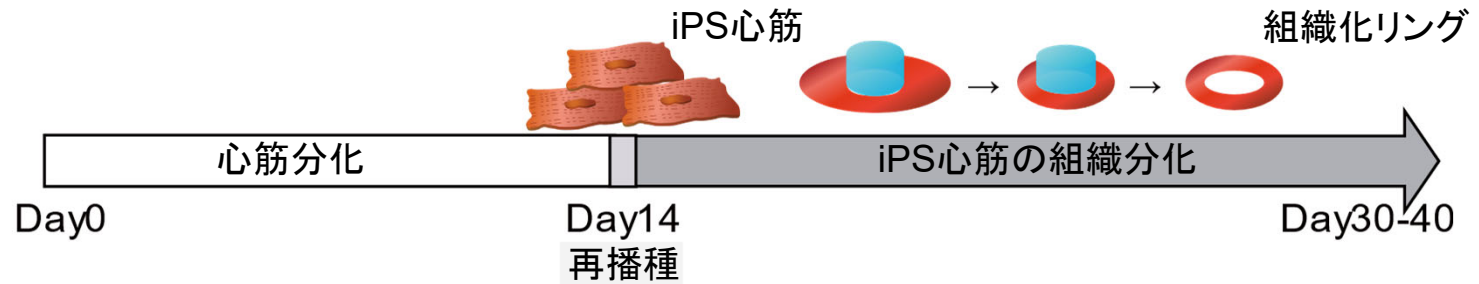
エレクトロポレーションを用いた
iPS細胞のゲノム編集



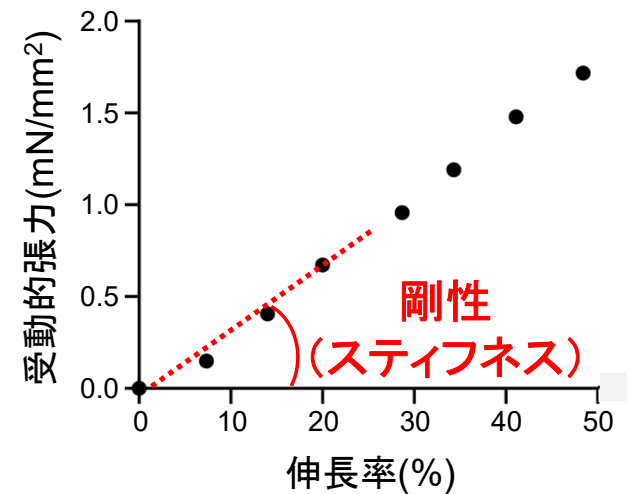
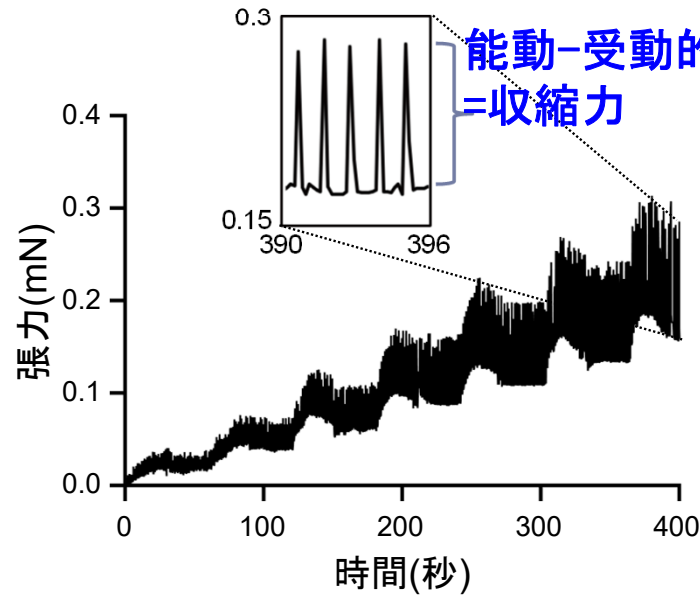
PLOD3 mRNA転写量解析



アイソジェニックiPS細胞由来分化心筋細胞の 三次元組織化と微小収縮力解析



Scale bar : 600 μ m

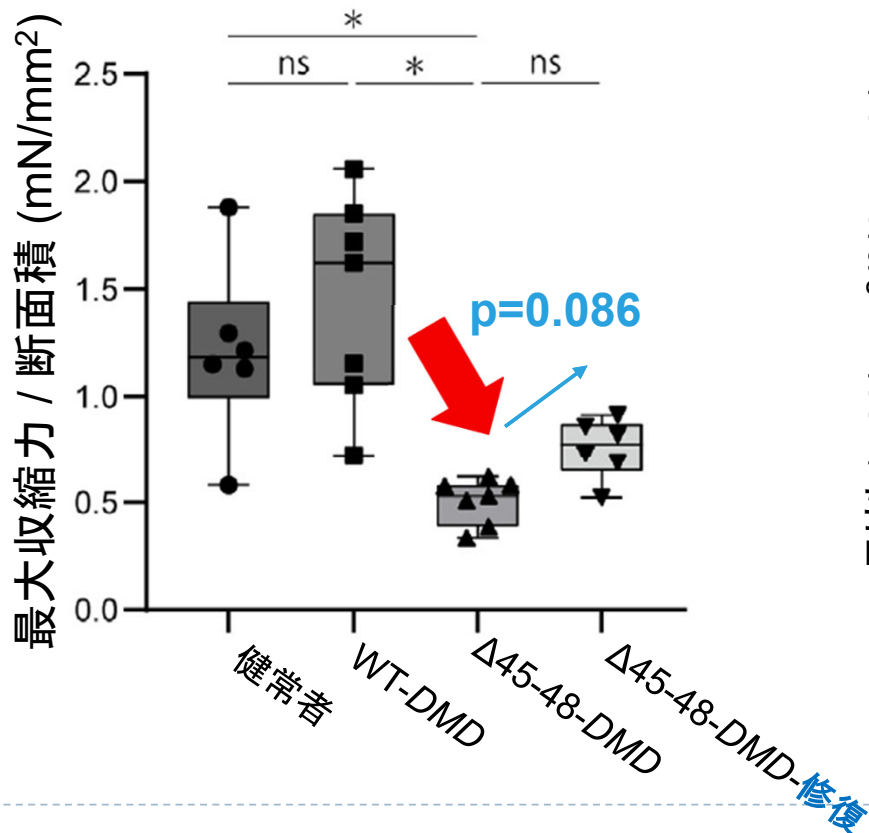


Communications biology 2020; 3(1):122

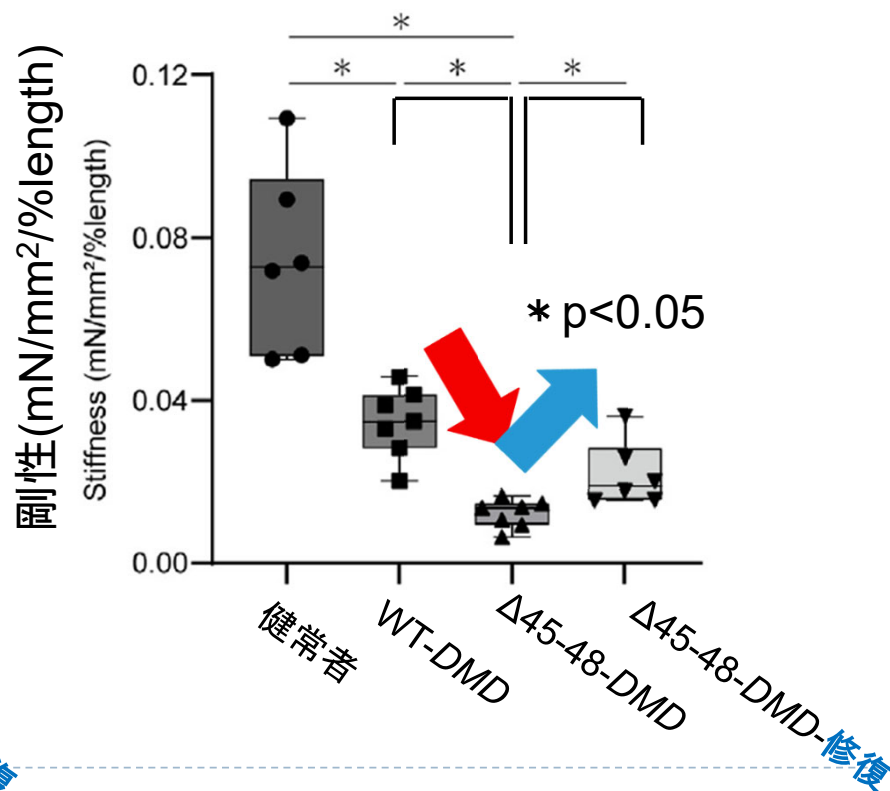
JACC Basic Transl Sci.2018;3(6):728-740

Δ45-48ジストロフィンとPLOD3 Y630X変異修復iPS細胞から作成した心筋組織化リングの機能評価解析

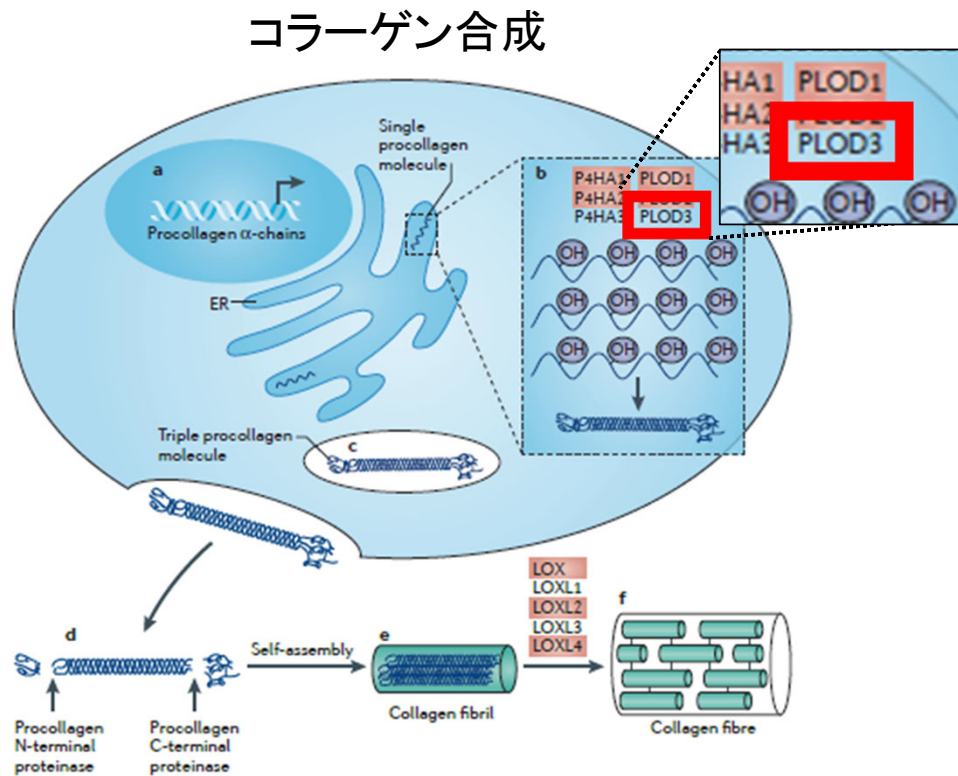
収縮力



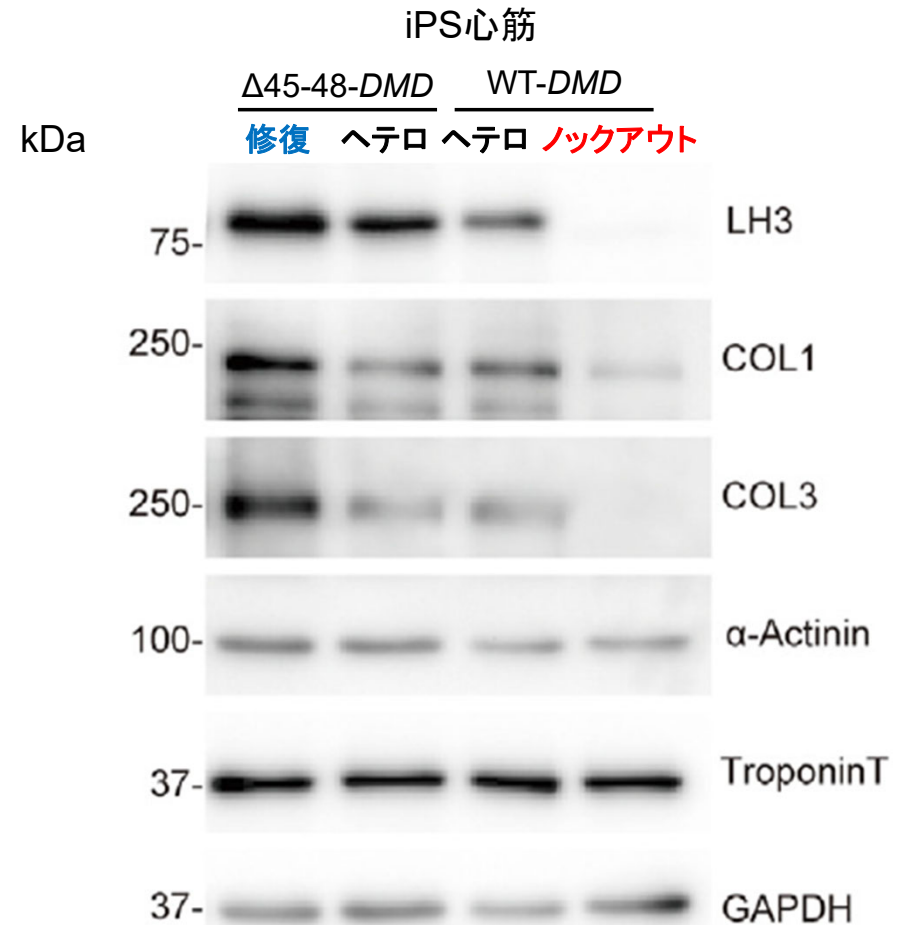
スティフネス



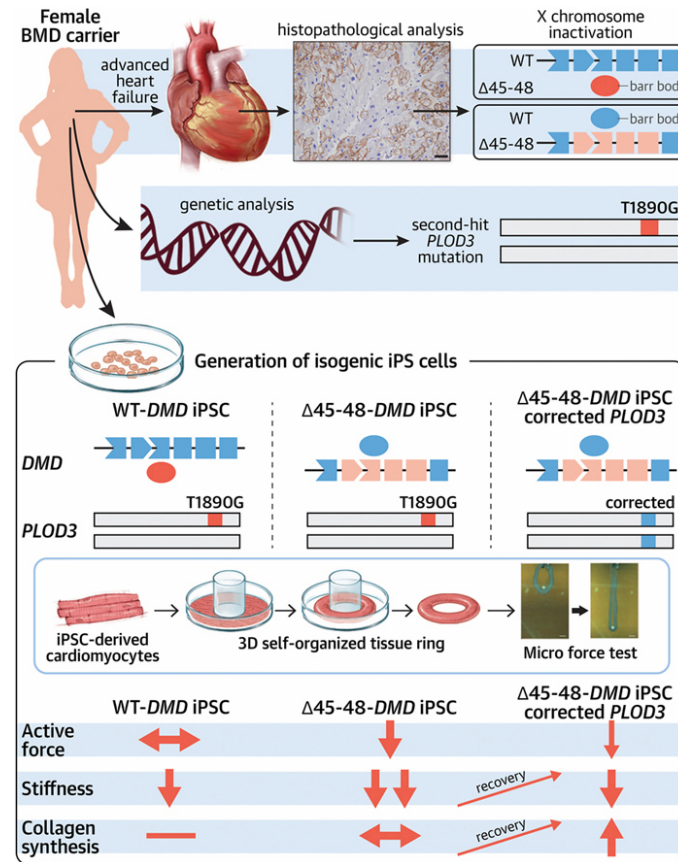
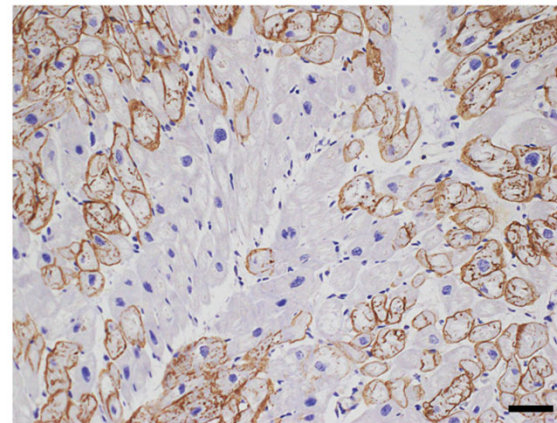
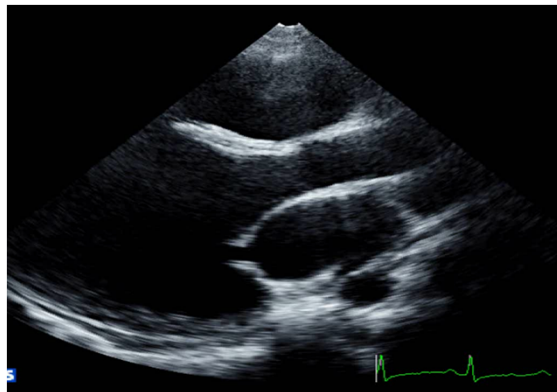
LH3(*PLOD3*)変異の修復によりコラーゲン合成が回復する



Nature Reviews Cancer 2014;14:430-439



重症心不全を呈したBecker型筋ジストロフィー女性キャリアー



□ ジストロフィン遺伝子変異に加え、コラーゲン生合成に関わる*PLOD3*遺伝子バリエントを同定した。

□ *PLOD3*バリエントが心筋スティフネス(硬さ)の低下、コラーゲン生合成の低下に関与していることを見出した。

COCでのAmplicon sequence panelの活用事例

両心不全を呈した拡張型心筋症

COCでのAmplicon sequence panelの活用事例

重症心不全を呈したBecker型筋ジストロフィー女性キャリアー

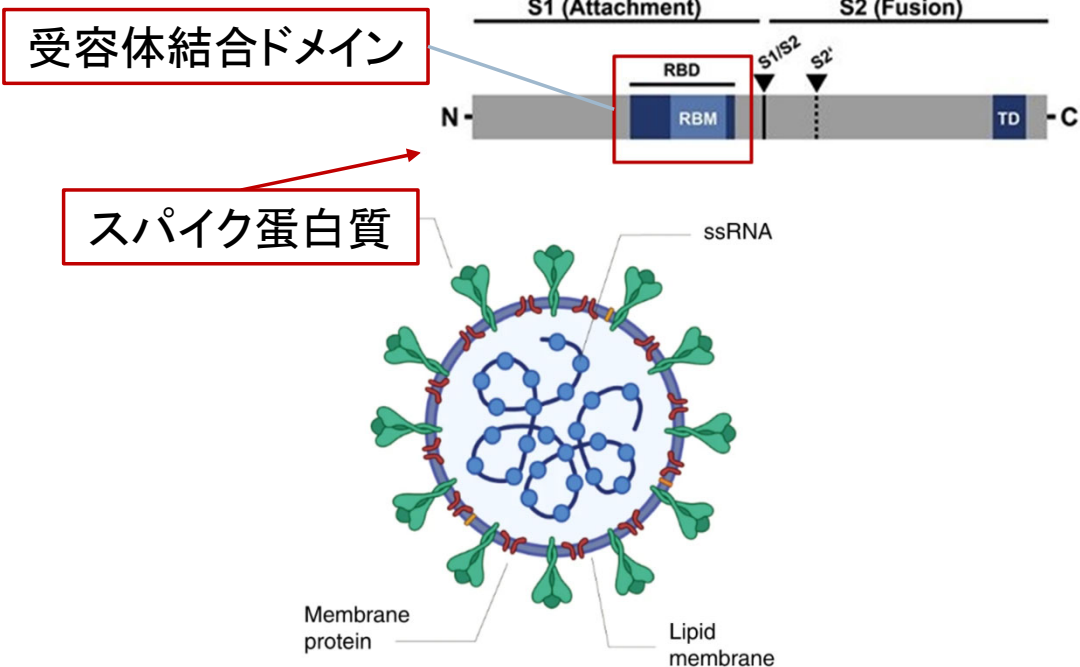
COCでのSingle cell RNA sequenceの活用事例

SARS-CoV-2スパイクタンパク質受容体結合ドメインが
ヒトiPS細胞由来分化心筋細胞に与える影響



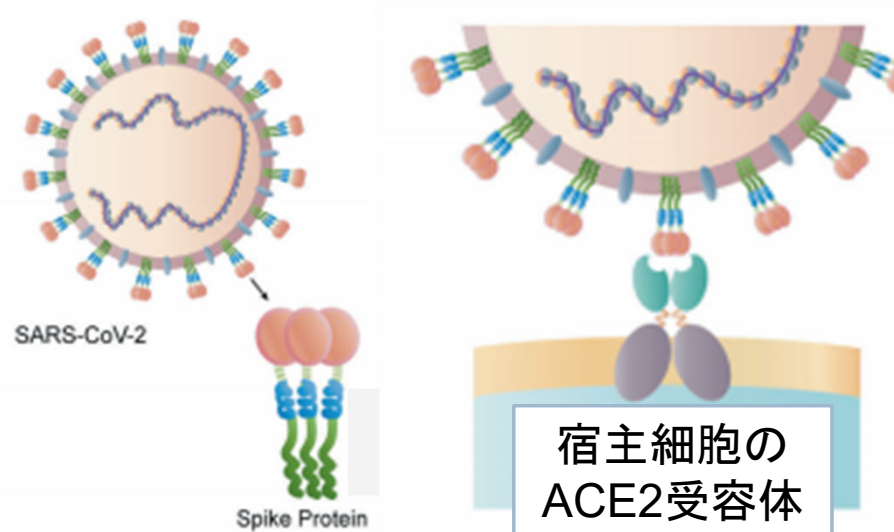
新型コロナウイルス感染症 (COVID-19)

SARS-CoV-2ウイルスの構造



Yang J, et al. Nat Commun. 2020;11:4541

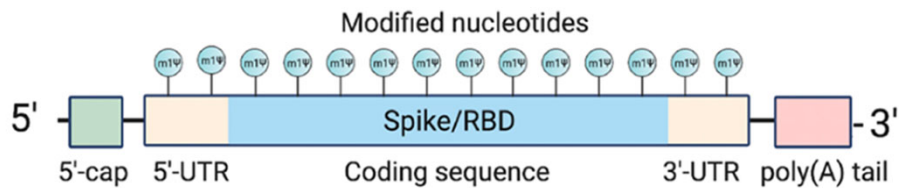
ACE2を介した宿主細胞への侵入



Huang Y, et al. Acta Pharmacologica Sinica. 2020;41:1141-1149

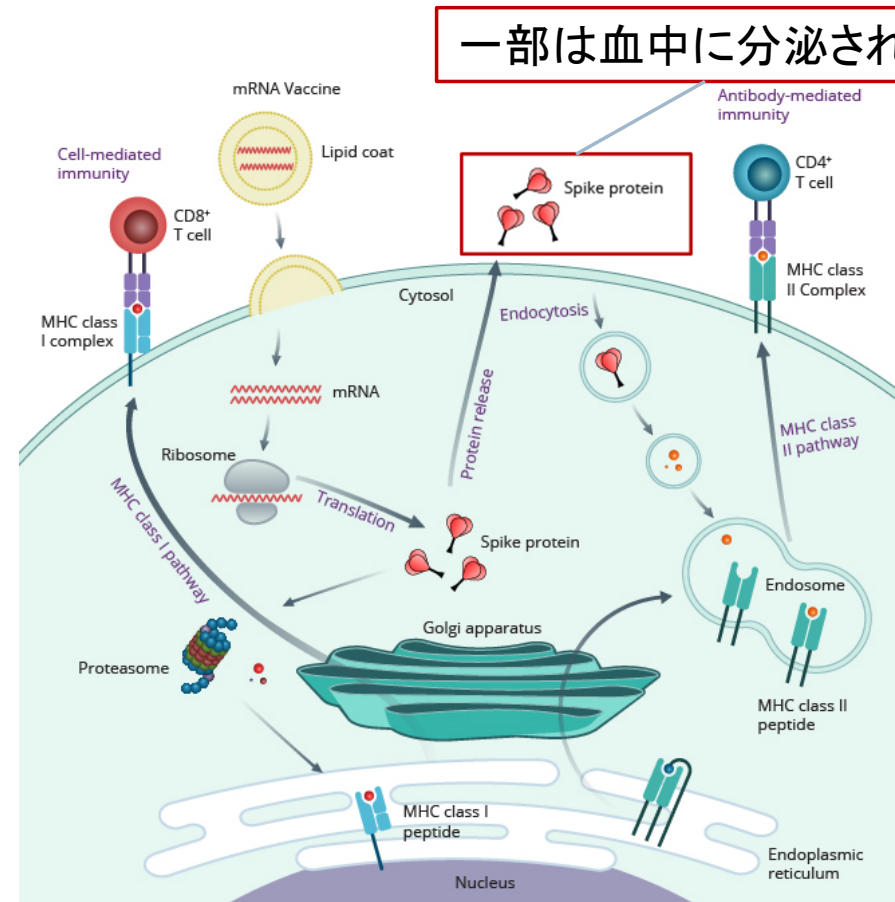
COVID-19 mRNAワクチン

mRNAワクチンの構造



Jackson NAC, et al. NPJ Vaccines. 2020;5:11

一部は血中に分泌される



Wadhwa A, et al. Pharmaceutics. 2020;12:102

COVID-19ワクチン後心筋炎

COVID-19ワクチン後心筋炎のケースシリーズ報告

Case series	Marshall et al ⁸	Rosner et al ⁹	Larson et al ¹¹	Abu et al ¹⁰	Kim et al ¹⁹	Montgomery et al ¹⁸
Cases, n	7	7	8	6	4	23
Case source	Hospitalized patients in different centers in USA	Hospitalized patients in 2 US centers	Hospitalized patients in Italy and USA	Hospitalized patients in Israel	Hospitalized patients in 1 US center	Case series from US Military Health System
Male sex, %	100	100	100	100	75	100
Median age (range), y	17 (14–19)	24 (19–30)	29 (21–56)	22 (16–45)	30 (23–70)	25 (20–51)
Vaccine type	All BNT 162b2 (Pfizer)	5 BNT162b2 (Pfizer), 1 mRNA-1273 (Moderna), 1 J&J	5 BNT 162b2 (Pfizer), 3 mRNA-1273 (Moderna)	BNT 162b2 (Pfizer)	2 BNT 162b2 (Pfizer), 2 mRNA-1273 (Moderna)	7 BNT 162b2 (Pfizer), 16 mRNA-1273 (Moderna)

Bozkurt B, et al. *Circulation*. 2021; 144:471-484

大規模接種開始後、心筋炎発症例が報告された。

COVID-19ワクチンに対する副反応

Event	Adverse-Event Cohort in Each Group	Vaccinated Group	Control Group	Risk Ratio (95% CI)	Risk Difference (95% CI)
	no. of persons	no. of events			
Lymphopenia	938,939	2	7	0.26 (0.00 to 1.03)	-0.9 (-2.0 to <0.1)
Myocardial infarction	892,785	59	60	1.07 (0.74 to 1.60)	0.8 (-3.3 to 5.2)
Myocarditis	938,812	21	6	3.24 (1.55 to 12.44)	2.7 (1.0 to 4.6)
Neutropenia	919,291	20	22	0.87 (0.46 to 1.66)	-0.5 (-2.8 to 1.8)
Other thrombosis [†]	932,469	12	22	0.46 (0.19 to 0.91)	-2.2 (-4.6 to -0.3)
Paresthesia	827,478	552	496	1.12 (0.98 to 1.24)	10.8 (-1.8 to 21.4)
Pericarditis	936,197	27	18	1.27 (0.68 to 2.31)	1.0 (-1.6 to 3.4)
Pulmonary embolism	937,116	10	17	0.56 (0.21 to 1.15)	-1.5 (-3.6 to 0.4)

Barda N, et al. *N Engl J Med*. 2021; 385:1078-1090

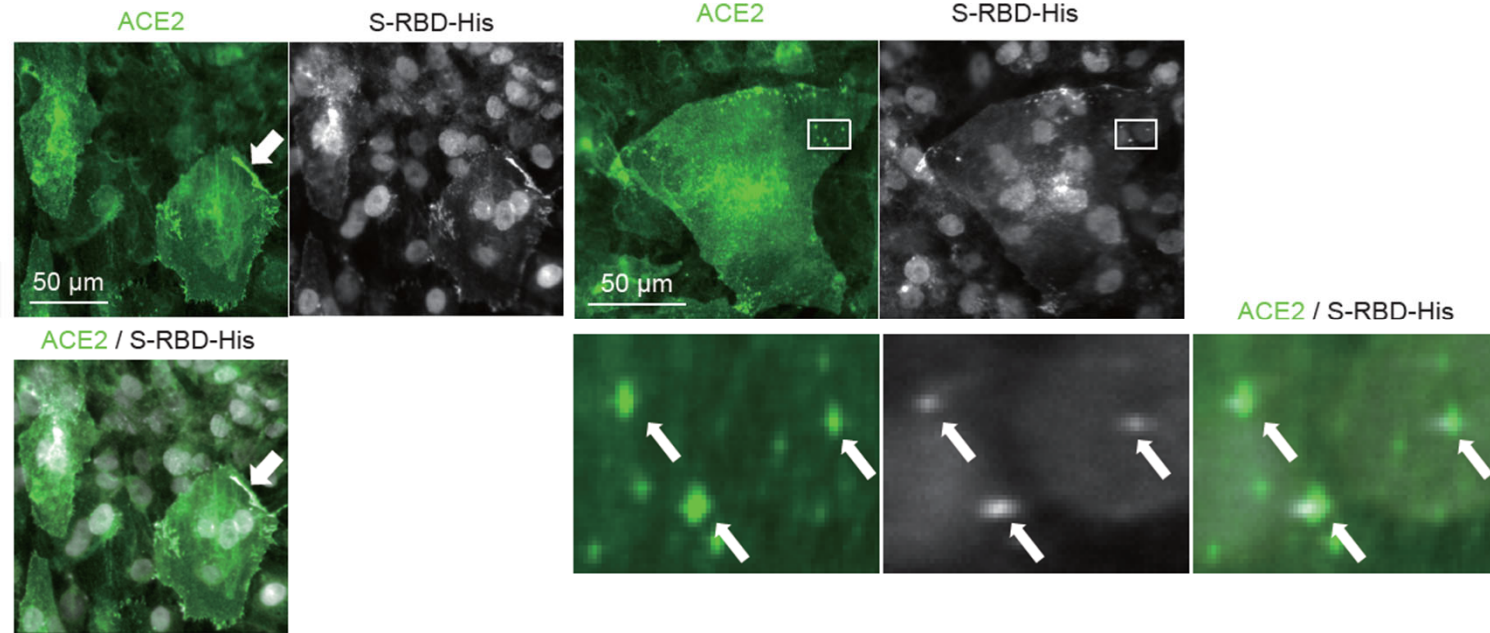
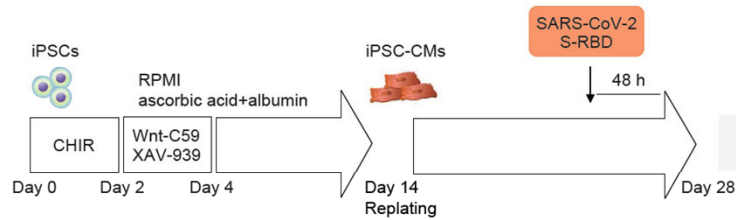
ワクチン接種群で有意に心筋炎発症リスクが高い。



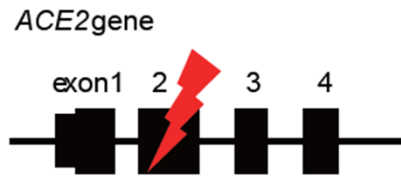
iPSC細胞由来心筋細胞におけるS-RBD/ACE2複合体の同定

心筋分化プロトコール
平面分化法

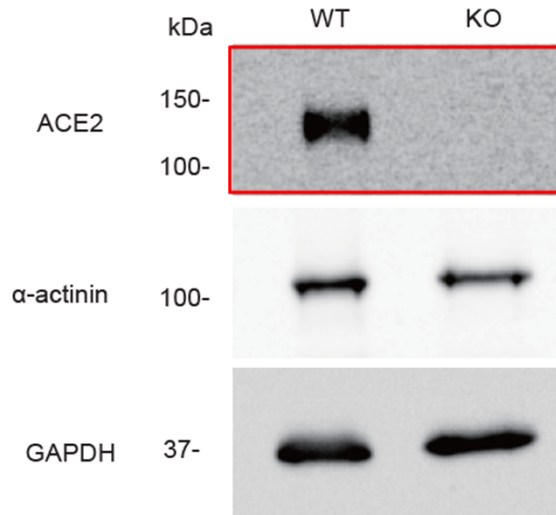
精製S-RBD投与後の免疫染色



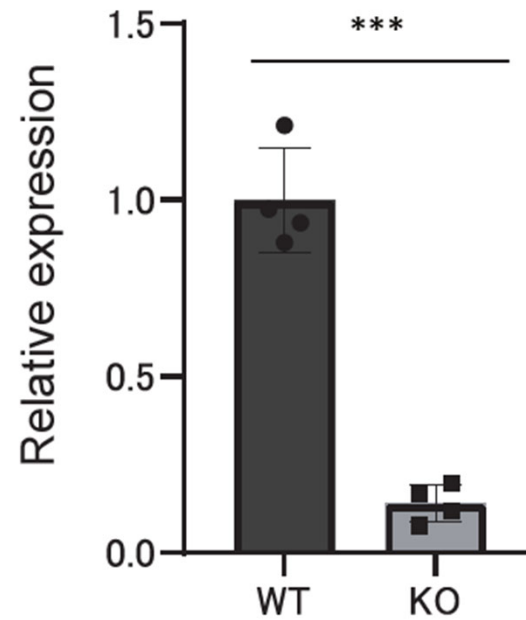
CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集による ACE2ノックアウトiPS細胞の作製



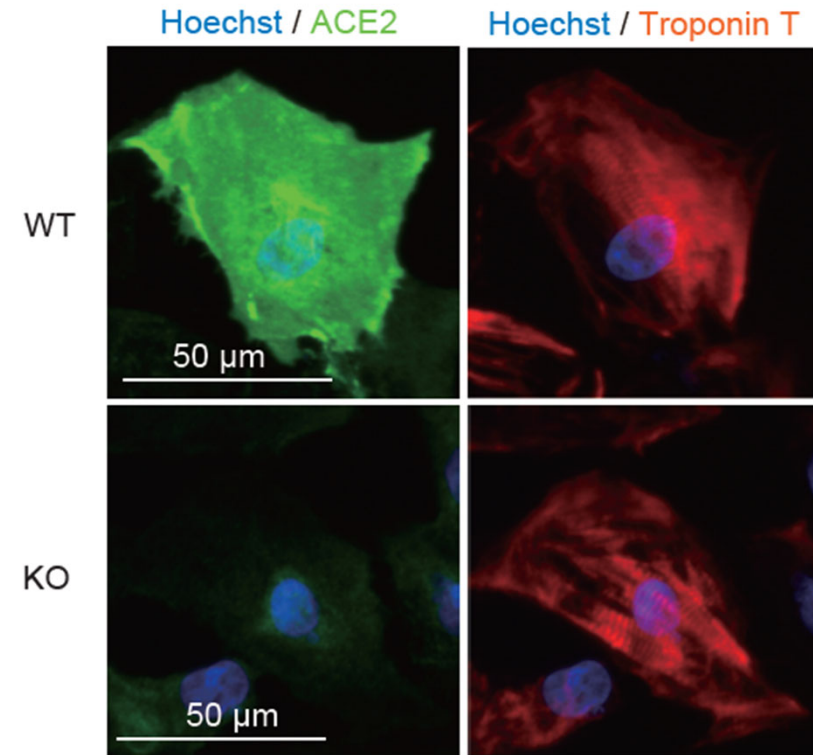
ACE2の蛋白質発現



定量評価

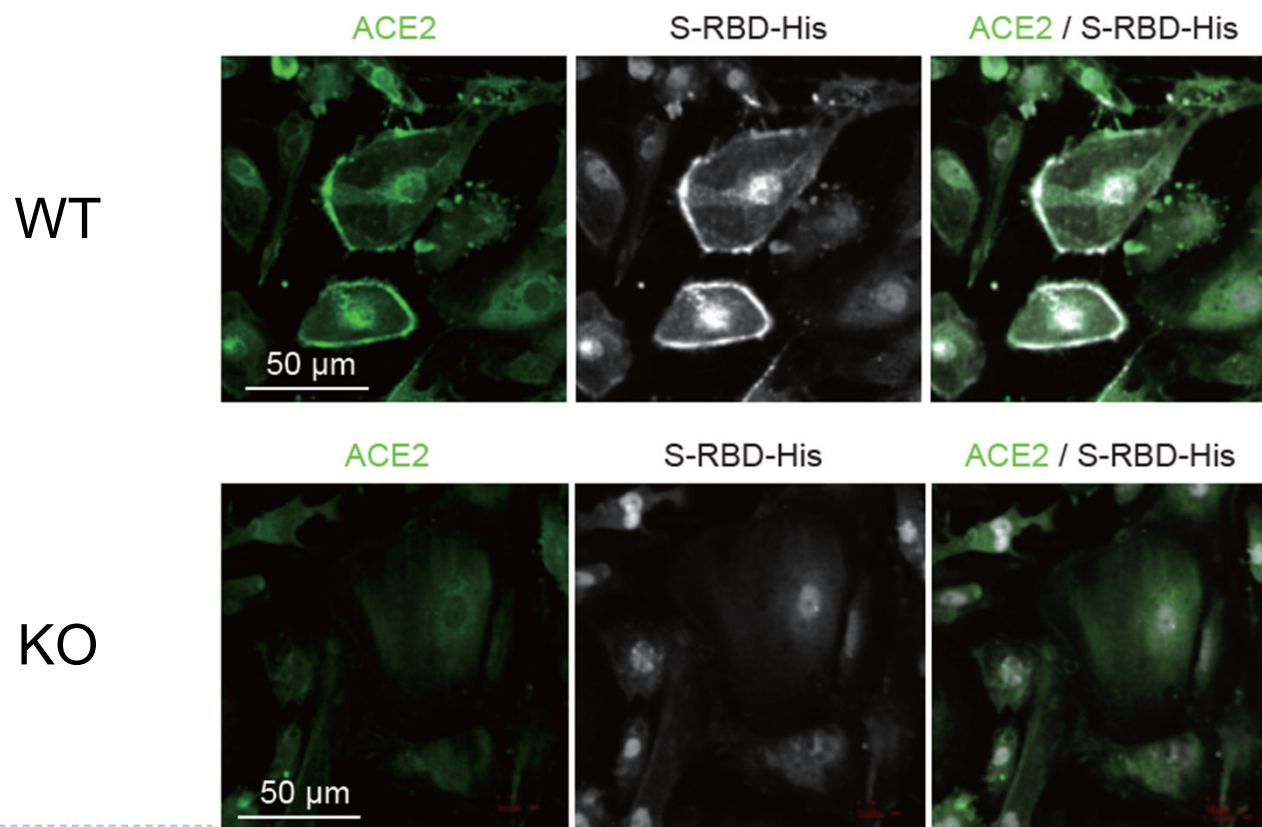


免疫染色



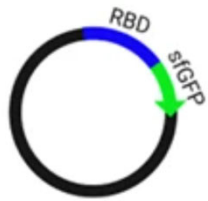
ACE2を介したiPS細胞由来心筋細胞へのS-RBDの取り込み

精製S-RBD投与後の免疫染色

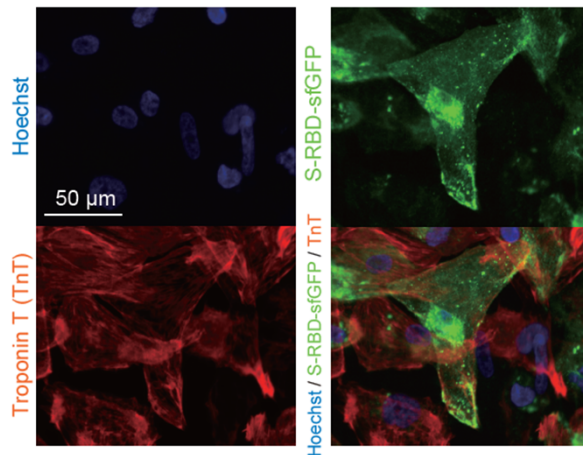


S-RBD-sfGFPを用いたライブイメージング

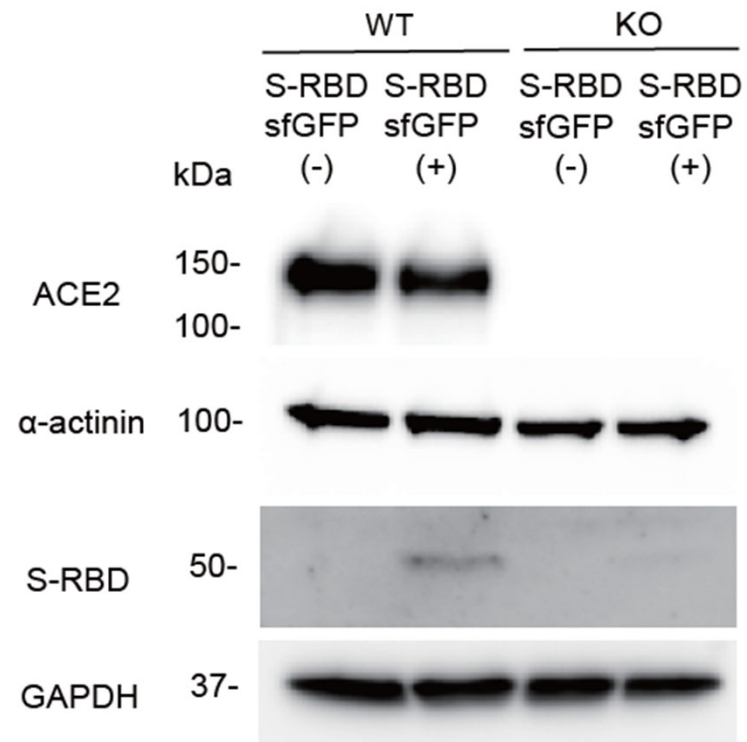
S-RBD-sfGFPプラスミド配列



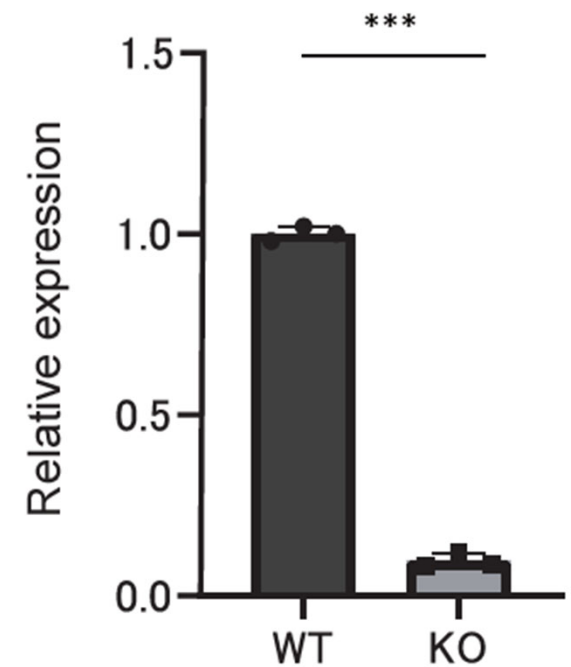
免疫染色



S-RBD-sfGFPの蛋白質発現

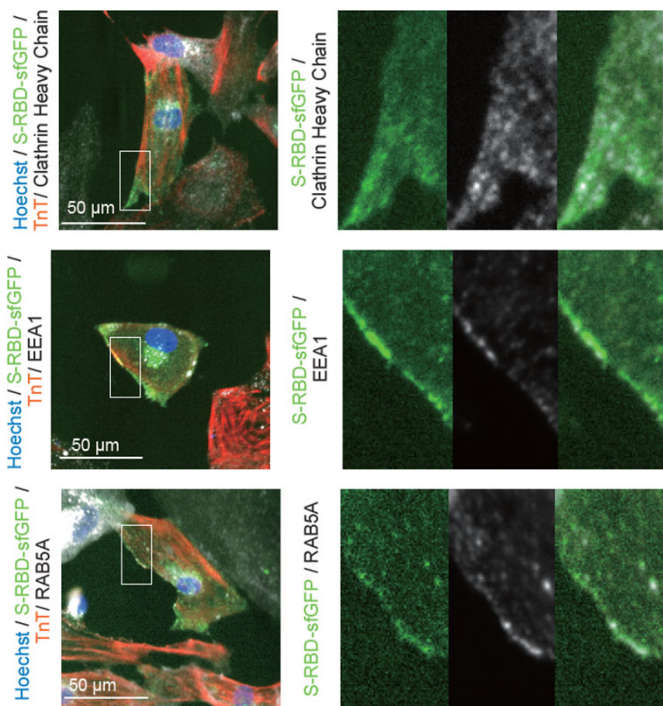


定量評価

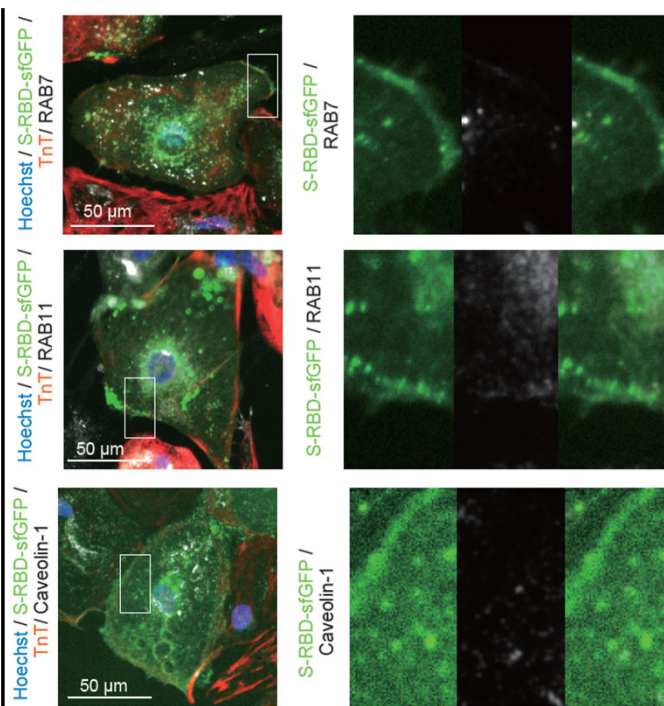


エンドリソーム経路介したS-RBD-sfGFPの取り込み

S-RBD-sfGFP投与1時間後

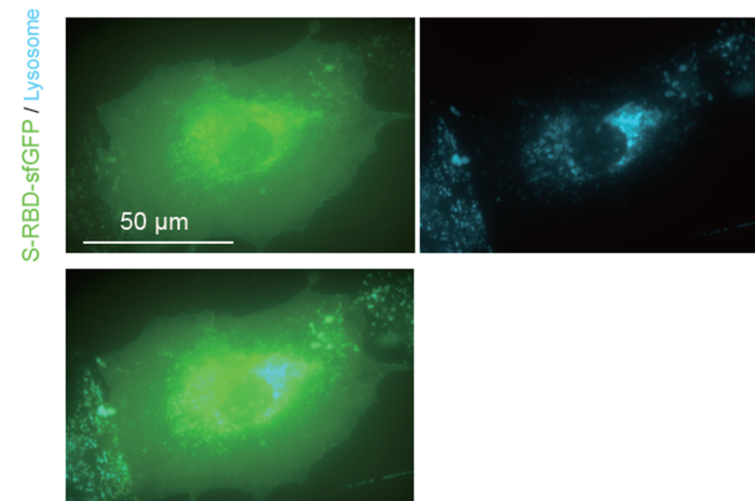


早期エンドソームと共局在あり



その他エンドソームと共局在なし

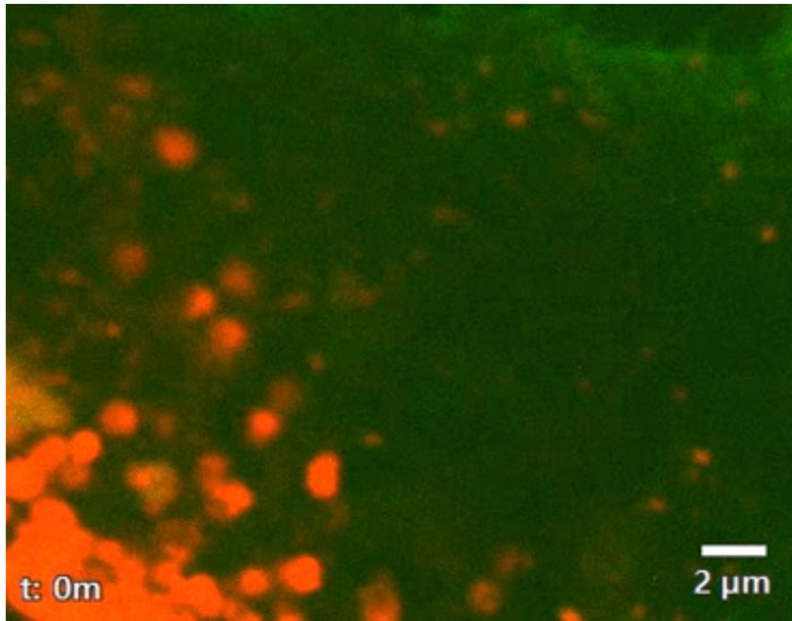
S-RBD-sfGFP投与24時間後



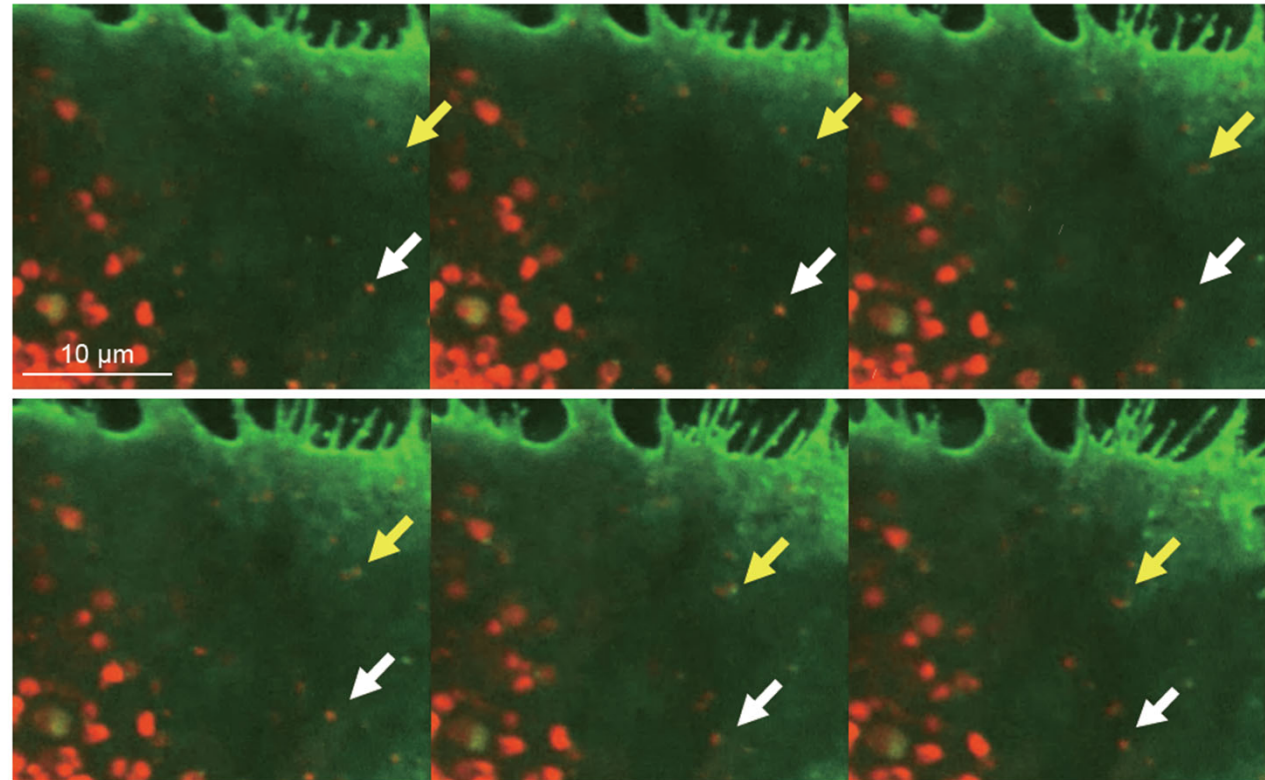
リソソームと共局在あり

共焦点顕微鏡を用いた ライブセルイメージング

DsRed-RAB5A
SARS-CoV-2 S-RBD-sfGFP

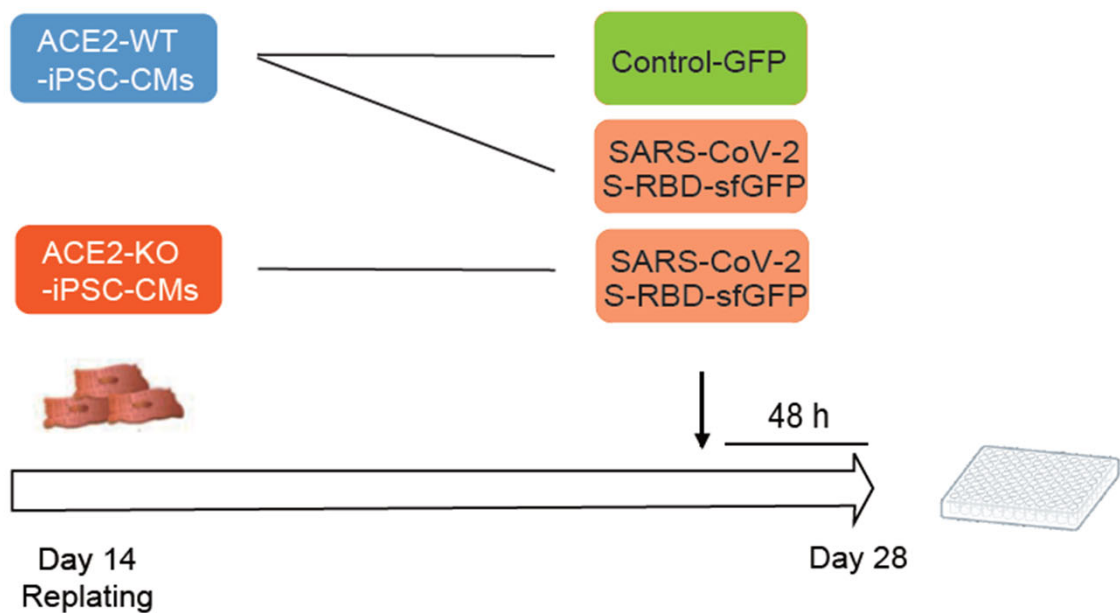


S-RBD-sfGFP / AAV2-DsRed-RAB5A

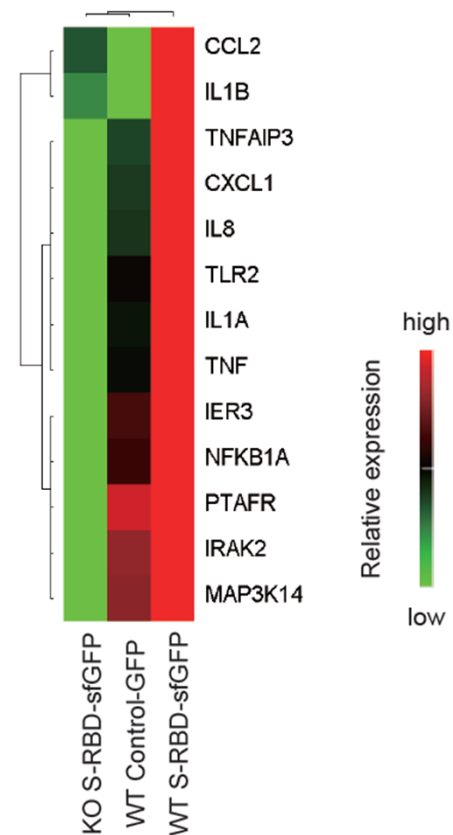


NF- κ B経路関連遺伝子のスクリーニング

NF- κ B経路関連遺伝子
定量PCRアレイ

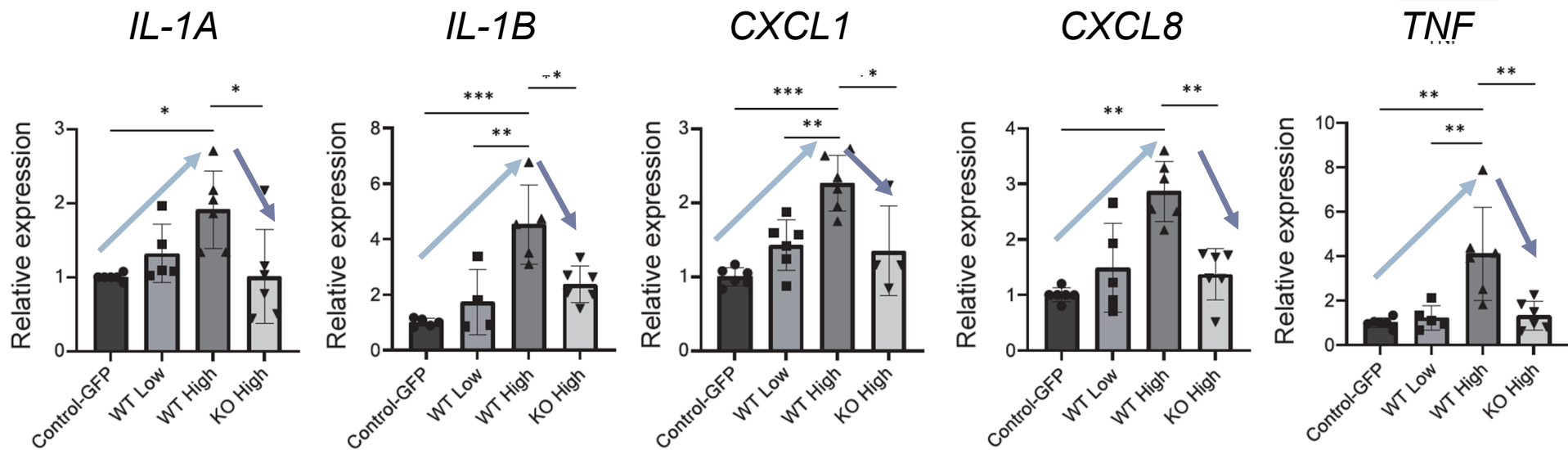


発現変化を認めた遺伝子群のヒートマップ

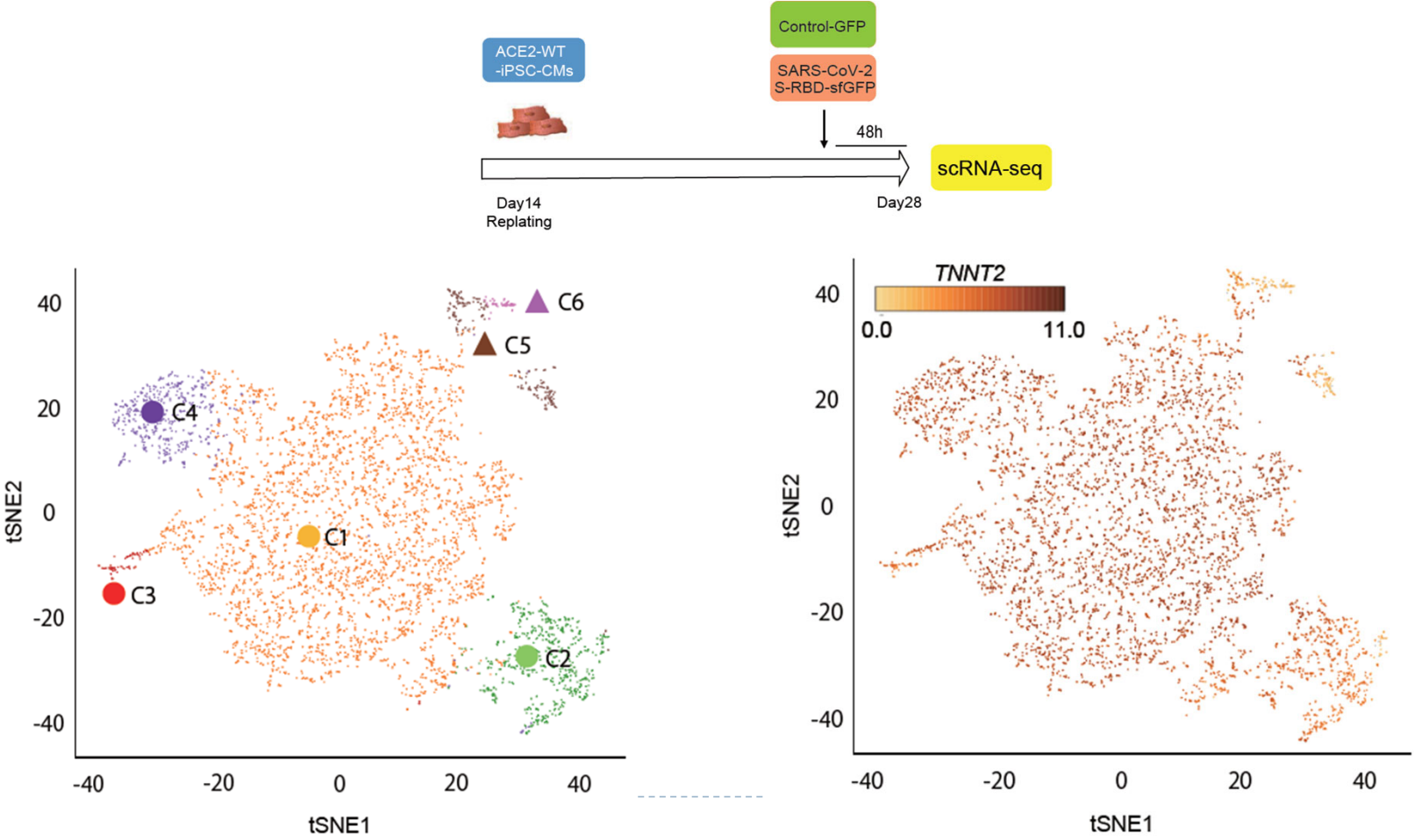


COCでの定量PCR解析を利用

S-RBDの取り込みによる炎症促進性サイトカイン遺伝子の発現上昇

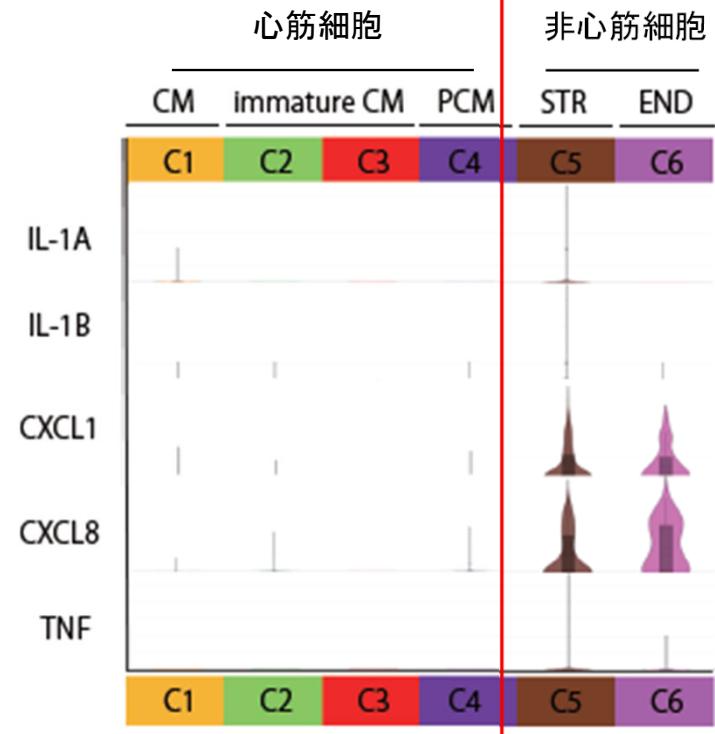
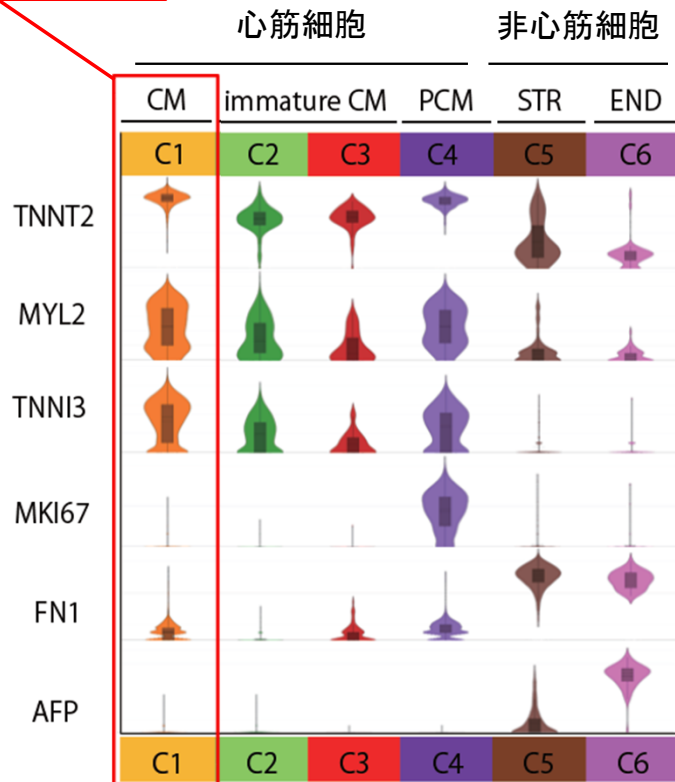


シングルセルRNA解析による心筋細胞と非心筋細胞のクラスター同定



心筋細胞特異的遺伝子と炎症促進性サイトカイン遺伝子のクラスター別発現量

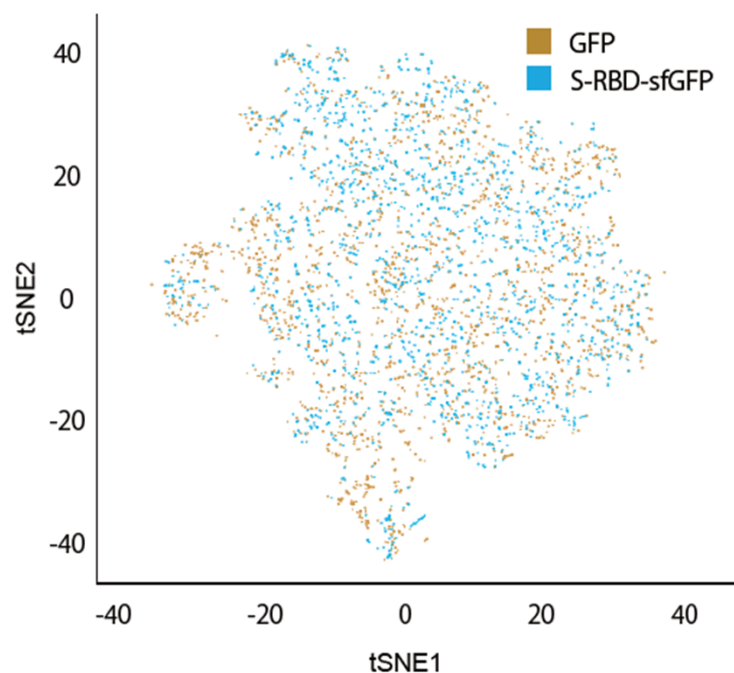
成熟心筋細胞



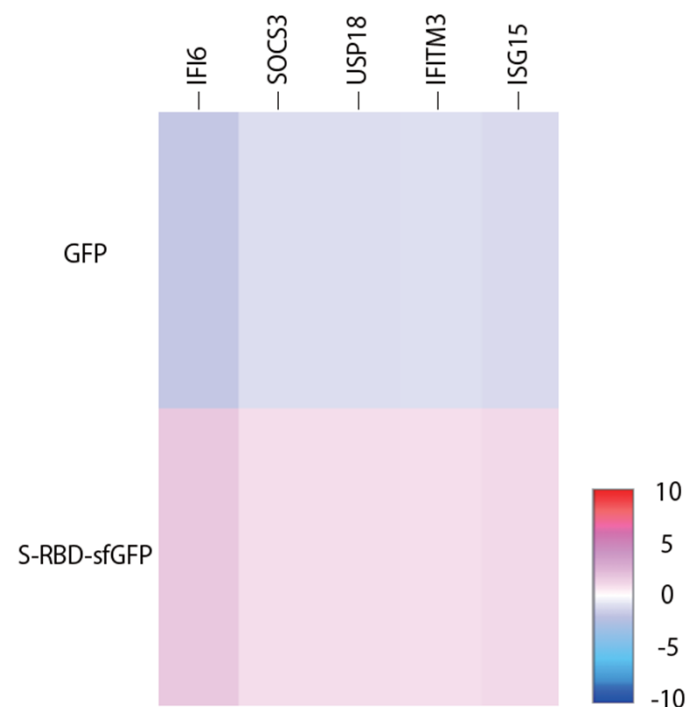
PCM = 増殖性心筋細胞、STR = 間質用細胞、END = 内胚葉由来細胞

成熟心筋細胞における S-RBDによるインターフェロン応答遺伝子の発現上昇

クラスター1のみを抽出して
再クラスタリング

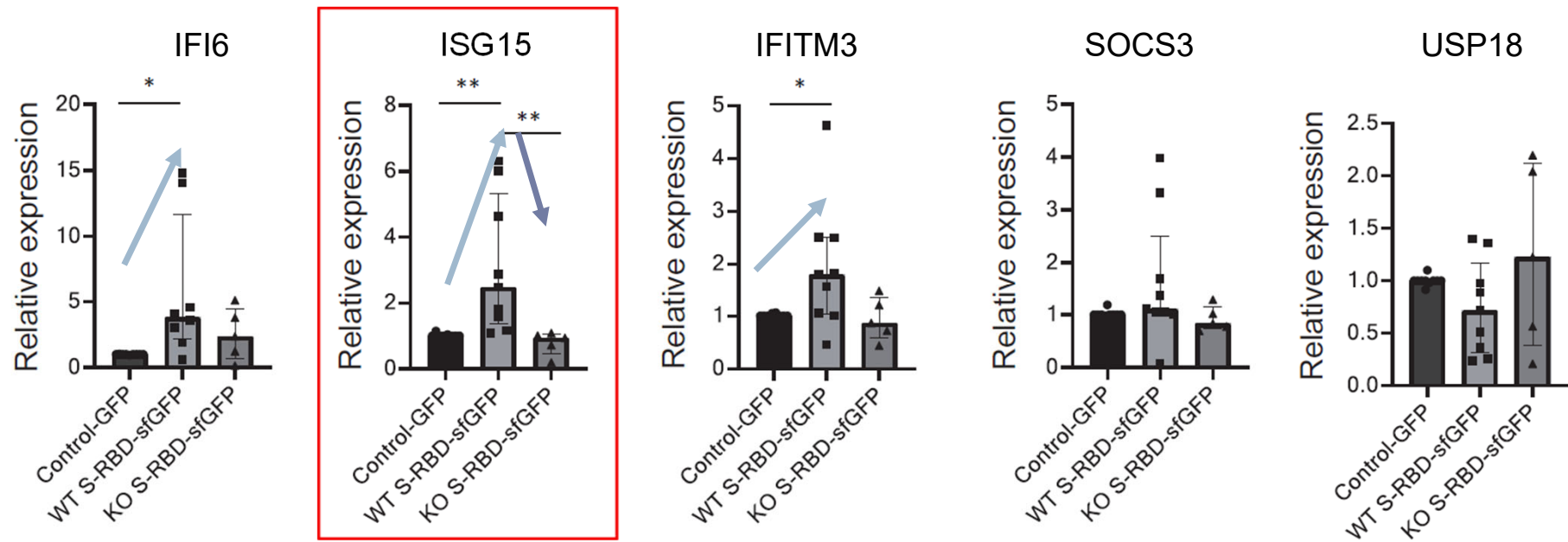


インターフェロン応答遺伝子



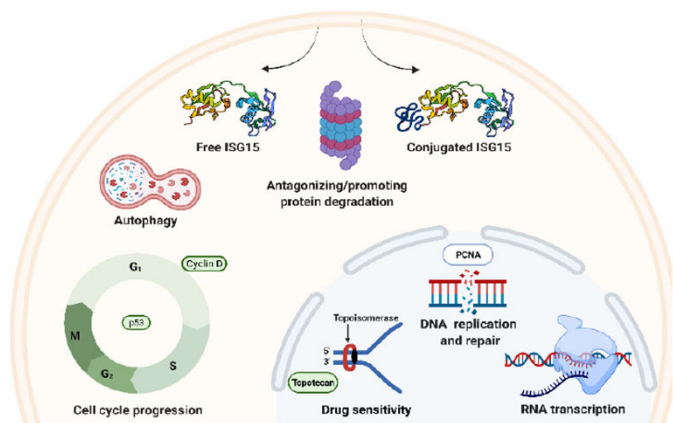
S-RBDの取り込みによるIFI6, ISG15, IFITM3の発現上昇

シングルセルRNA解析により同定されたインターフェロン応答遺伝子



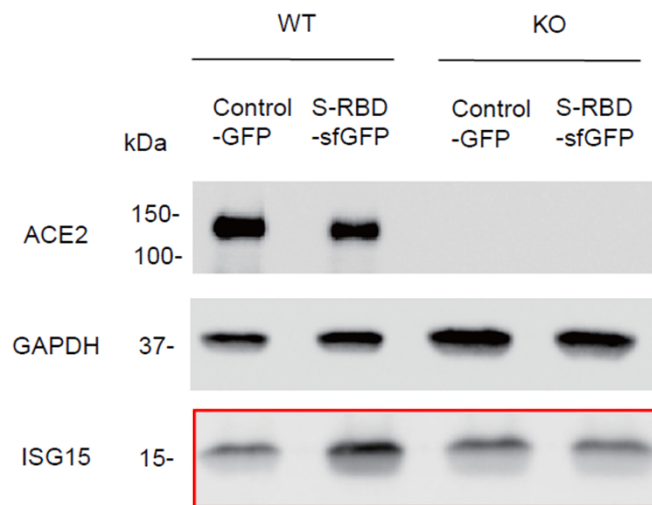
S-RBDの取り込みによるISG15蛋白質の発現上昇とISG化の促進

ISG15 ユビキチン様蛋白質
ウイルスや異物に反応して
ISG化と呼ばれる翻訳後修飾を担う

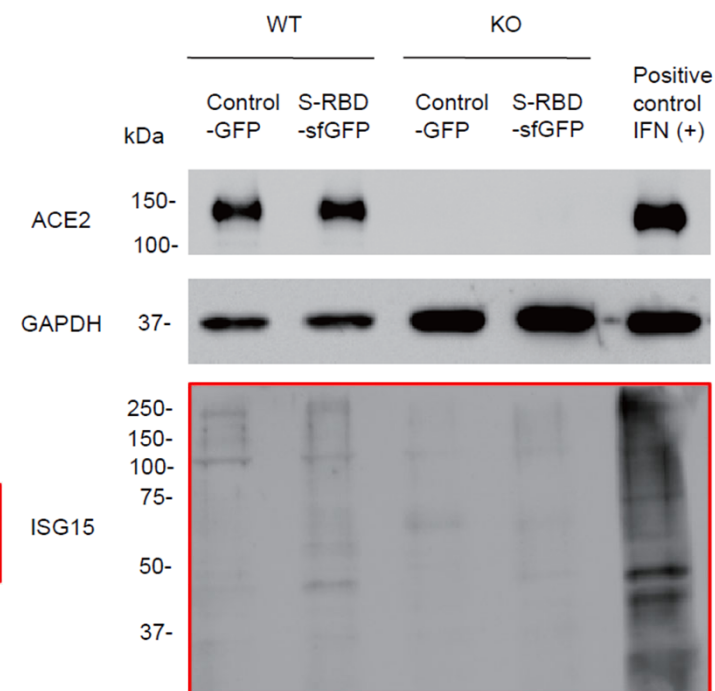


Mirzalieva O, et al. Cells. 2022; 11:538

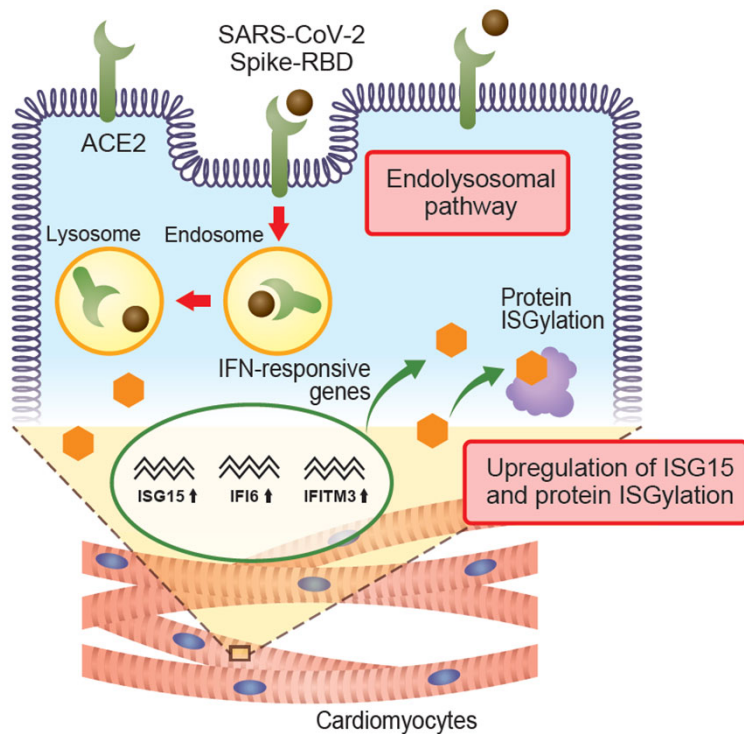
ISG15の蛋白質発現



ISG化による 共役蛋白質の発現



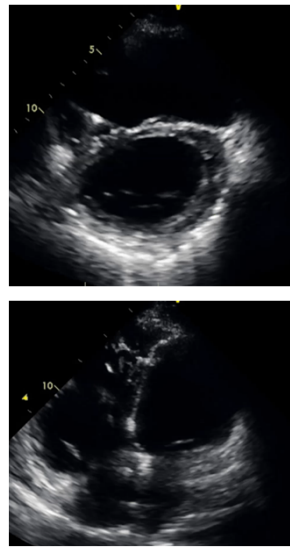
SARS-CoV-2スパイクタンパク質受容体結合ドメインがヒトiPS細胞由来分化心筋細胞に与える影響



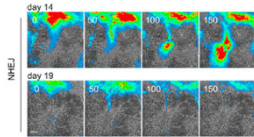
- ✓ ヒトiPS細胞由来心筋細胞におけるACE2を介したS-RBD/ACE2複合体の取り込みを同定した。
- ✓ S-RBD-sfGFPはiPS細胞由来心筋細胞にエンドリソソーム経路を介して取り込まれた。
- ✓ iPS細胞由来心筋細胞においてS-RBDの取り込みによりインターフェロン応答遺伝子が有意に発現上昇した。
- ✓ iPS細胞由来心筋細胞においてS-RBDはISG15の発現上昇とISG化を促進した。

難治性心筋症ヒトモデル細胞の樹立と病態解明

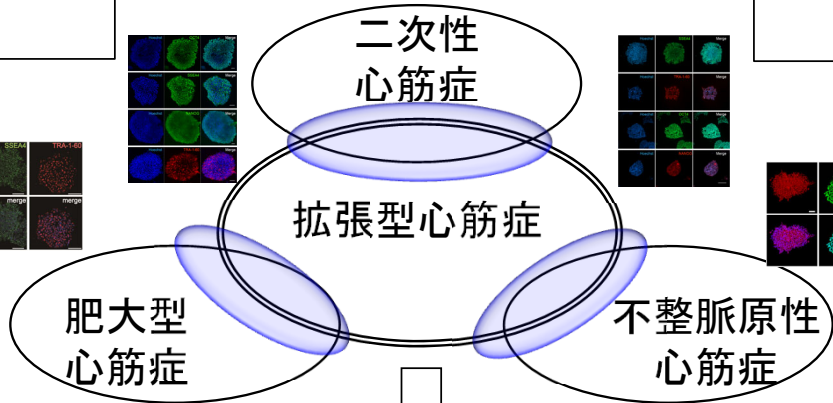
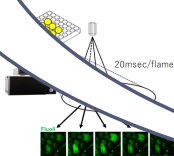
難治性心筋症分子基盤を是正する治療法の開発



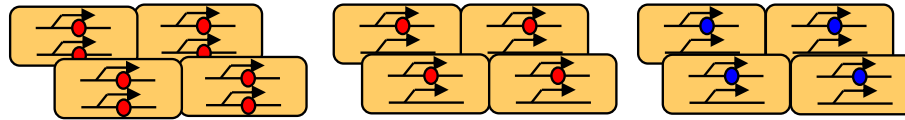
Motion Vector解析



アイコンテント
イメージング



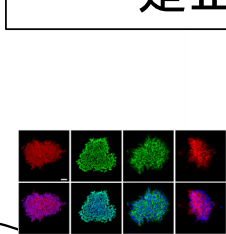
疾患iPS細胞の樹立と精密なアレル改変



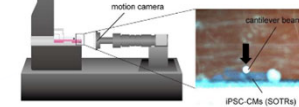
難治性心筋症ヒトモデル細胞を用いた機能解析

http://www.cardiology.med.osaka-u.ac.jp/?page_id=33635

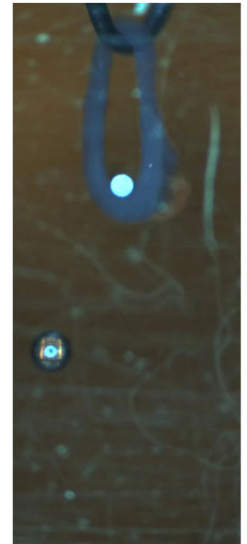
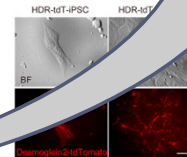
難治性心筋症分子基盤を是正する治療法の開発



マイクロスケール
圧縮強度測定



ゲノム編集に
イメージング

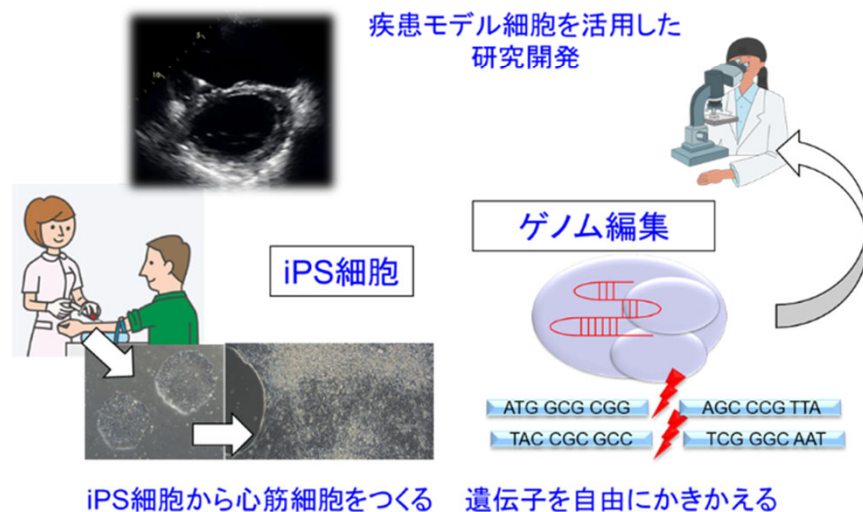


分子機能による層別化を目的とした 心筋症疾患iPS細胞ライブラリーの構築

疾患iPS細胞バンクについて

心筋症は、心臓の収縮する力が低下して、息切れやむくみなどの心不全症状を起こす病気です。原因は不明で、有効な治療法は限られており、次第に進行して、軽い運動や場合によっては安静にしても心不全症状が起きることがあります。病気が進行した場合、補助人工心臓や心臓移植が必要になることがあります。

大阪大学循環器内科では、公的研究費の支援を受け、心筋症の患者さんやご家族、健常ボランティアの方々にご協力頂き、血液に含まれる細胞からiPS細胞をつくりだす研究を行っています。作成したiPS細胞は公的バンクに寄託し、iPS細胞から作成した心筋細胞を利用して、多くの共同研究期間と一緒に、診断や治療法へつなげるための研究開発を行っています。



診断名など	樹立数	理研BRC 寄託数
拡張型心筋症	9	4
肥大型心筋症	11	4
拡張相肥大型心筋症		
拘束型心筋症	1	
不整脈原性心筋症	2	1
その他の心筋症	1	
健常ボランティア	6	1
患者さんご家族		

2023年9月29日

http://www.cardiology.med.osaka-u.ac.jp/?page_id=37921