

令和 5 年 4 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16057

研究課題名(和文) iPS細胞由来右室心筋を用いたBrugada症候群の病態解析

研究課題名(英文) Pathophysiological analysis of Brugada syndrome using iPS cell-derived right ventricular cardiomyocytes

研究代表者

齋藤 幸弘 (Saito, Yukihiro)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：20724454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：健康人iPS細胞から、左室および右室心筋細胞を別々に誘導する方法を確立し、左室および右室心筋細胞の性質から、異なる心筋細胞が生じていることを見出した。現在、論文投稿中である。加えて、Brugada症候群患者3名に由来する皮膚線維芽細胞からiPS細胞を作製した。Brugada症候群患者由来iPS細胞から左室および右室心筋細胞分化誘導を行った。細胞株ごとに、細胞播種密度と低分子化合物の濃度の組み合わせを最適化する必要があり、時間を要したが、いずれの細胞株からも左室および右室心筋細胞に相当する心筋細胞を誘導することができた。具体的な解析までは至らなかったため、今後心筋細胞の解析を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトiPS細胞によって、患者自身の心筋細胞を研究に用いることができるようになった。一方で、疾患を生じる心臓の部位には特徴のある疾患については、特徴を示しうる心筋細胞をiPS細胞から誘導することが重要であるはずである。本研究において確立された、健康人および患者由来iPS細胞から左室および右室心筋細胞を別々に効率よく誘導する方法は、Brugada症候群、不整脈原性右室心筋症、肺高血圧症、先天性心疾患などの右室疾患に対する細胞モデル研究をサポートする意義のある成果である。

研究成果の概要(英文)：We established a method to induce left ventricular and right ventricular cardiomyocytes separately from healthy human iPS cells and found that the properties of left and right ventricular cardiomyocytes were different. The paper is currently being submitted for publication. In addition, we generated iPS cells from skin fibroblasts derived from three patients with Brugada syndrome, and induced differentiation of left ventricular and right ventricular cardiomyocytes from the iPS cell lines. Although it took time to optimize the combination of cell seeding density and concentration of low molecular weight compounds for each cell line, we were able to induce cardiomyocytes corresponding to left ventricular and right ventricular cardiomyocytes from all cell lines. Since we were not able to perform specific analysis, we plan to analyze the cardiomyocytes in the future.

研究分野：循環器内科学

キーワード：iPS細胞 右室心筋細胞 二次心臓領域

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

[背景 1] 2007年のヒト iPS 細胞樹立以降、患者の細胞から誘導した iPS 細胞を用いた疾患モデル作製が行われてきた。心疾患領域では、QT 延長症候群患者や心筋症患者由来の iPS 細胞から誘導された心筋細胞は、それぞれの疾患を反映する特徴を示すことが報告されている (Itzhaki et al. *Nature*. 2011; Sun et al. *Sci Transl Med*. 2012)。また、右室優位に病変を来す Brugada 症候群や不整脈源性右室心筋症の疾患解析も報告されているが、iPS 細胞から誘導された心筋細胞が本当に右室様なのかは証明されていない (Liang et al. *J Am Coll Cardiol*. 2016 ; Kim et al. *Nature*. 2013)。これらの疾患解析には、高純度の右室心筋を使用することでよりよい疾患モデルが作製できると予想されるが、右室心筋の特異的誘導方法の報告はない。

[背景 2] Brugada 症候群は、東アジアで比較的有病率が高く、社会的損失の大きい青壮年の突然死の原因となる疾患である (Milman et al. *Heart Rhythm*. 2019)。心室細動による突然死予防に有効であることが証明された唯一の治療法は植込み型除細動器の植込みであり、薬物治療に高いエビデンスはいまだない。これまでにさまざまなリスクの層別化項目が検討され、SCN5A 遺伝子異常の有無もその一つとして報告されているが (Yamagata et al. *Circulation*. 2017)、遺伝子異常のみから機能異常の程度や予後を予想するのは現時点では困難であり、さらなる病態解析研究が必要とされている。

### 2. 研究の目的

[目的 1] ヒト iPS 細胞から右室心筋細胞を分化誘導する条件を決定する。

左室は主に一次心臓領域から、そして右室は主に二次心臓領域から発生するため、発生段階の左室心筋と右室心筋のプロファイルは大きく異なる。(Srivastava et al. *Cell*. 2006)。一次心臓領域に比べて、二次心臓領域では TBX5 の発現が非常に低く、二次心臓領域に由来する心房筋は TBX5 を発現するが、右室心筋では TBX5 の発現は抑制されたままである (Bruneau et al. *Dev Biol*. 1999)。このことから、NKX2-5/TBX5 レポーター導入ヒト ES 細胞を使って NKX2-5 陽性/TBX5 陰性心臓前駆細胞 (二次心臓領域に相当) および NKX2-5 陽性/TBX5 陰性心筋細胞 (右室心筋細胞に相当) を誘導する条件を探索する。そして、他の iPS 細胞株でもその分化条件が適用できるかどうかを確認する。

[目的 2] 右室心筋細胞を用いた Brugada 症候群のモデルを作製する。

不整脈の発生には、基質、誘因およびトリガーの 3 つが関連する。以前は基質的異常のない不整脈疾患と考えられていたが、近年、左房の拡大 (Toh et al. *Heart Rhythm*. 2010) や右室および右室流出路心外膜側の線維化 (Nademanee et al. *J Am Coll Cardiol*. 2015) が報告されている。これらの基質的異常の特徴を Brugada 症候群 iPS 細胞由来右室心筋細胞が反映しうるのかを検討する。

### 3. 研究の方法

[方法 1: ヒト iPS 細胞から右室心筋細胞の誘導]

1-1. NKX2-5/TBX5 レポーター導入ヒト ES 細胞を用いて、右室心筋細胞誘導方法のスクリーニングを行う。

1-2. 複数のヒト iPS 細胞株を用いて、右室心筋分化法の最適化を行う。

心筋分化研究において、細胞株間の違いは研究の再現性にかかわる重大な要因である。そのため、いずれの細胞株においても適用できる頑健なプロトコルを確立する。

1-3. ヒト iPS 細胞由来右室心筋細胞の特徴を評価する。

iPS 細胞由来左室心筋細胞と右室心筋細胞の遺伝子発現パターン、Ca トランジェント、自律拍動数等を比較し、その特徴を明らかにする。

[方法 2: Brugada 症候群患者由来 iPS 細胞を用いた疾患モデル作製]

2-1. Brugada 症候群患者の体細胞から iPS 細胞を誘導する。

2-2. Brugada 症候群患者由来 iPS 細胞から右室心筋細胞を誘導する。

2-3. Brugada 症候群 iPS 細胞由来右室心筋細胞の特徴の解析を解析する。

### 4. 研究成果

本研究において以下の 3 点について成果を得た。

[成果 1-1] 健康人 iPS 細胞 (当研究室で作製した細胞株と市販の細胞株) から、左室様および右室様心筋細胞を別々に誘導する方法を確立し、第 86 回日本循環器学会学術集会で発表を行った。健康人由来 iPS 細胞から誘導した左室様および右室様心筋細胞の性質 (細胞サイズ、カルシウムトランジェント、自律拍動頻度、遺伝子発現パターン) を比較検討し、異なる心筋細胞が生じていることを見出した。

[成果 1-2] 当実験室で作製した iPS 細胞株だけでなく、市販の 201B7 iPS 細胞株でも左室心筋細胞と右室心筋細胞を別々に誘導しうることが確認できた。現在、論文投稿中である。

[成果 2-1] Brugada 症候群患者 3 名に由来する皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を作製した。いずれも特徴的な心電図波形と若年突然死家族歴を有する患者であるが、1 例は SCN5A 遺伝子変異を有するものの心室性不整脈や失神エピソードを有しない患者、2 例は SCN5A 遺伝子変異を有しないが繰り返す心室細胞エピソードを有する患者を選択した。

[成果 2-2] Brugada 症候群患者由来 iPS 細胞から左室および右室心筋細胞分化誘導を行った。細胞株ごとに、細胞播種密度と低分子化合物の濃度の組み合わせを最適化する必要があり、時間を要したが、いずれの細胞株からも右室心筋細胞に相当する TBX5 陰性心臓前駆細胞に由来する TBX5 低発現心筋細胞を誘導することができた。具体的な解析までは至らなかったため、今後心筋細胞の解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋藤 幸弘、中村 一文、伊藤 浩
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来右室心筋細胞の誘導
3. 学会等名 第25回日本心不全学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤 幸弘、中村 一文、伊藤 浩
2. 発表標題 Different Heart Field Progenitors and Chamber Cardiomyocytes Derived from Pluripotent Stem Cells
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤 幸弘、中村 一文、伊藤 浩
2. 発表標題 Characteristics of right ventricular cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells
3. 学会等名 第39回国際心臓研究学会 日本部会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------