

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590779
 研究課題名（和文） 遺伝性QT延長症候群由来ヒト心筋細胞を用いた薬剤誘発性QT延長症候群の病態解明
 研究課題名（英文） Analysis of drug-induced hereditary long QT syndrome using induced pluripotent stem cells from patients with hereditary long QT syndrome
 研究代表者
 丹羽 良子 (NIWA RYOKO)
 名古屋大学・環境医学研究所・研究員
 研究者番号：00216467

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒト体細胞由来の iPS 細胞を心筋に分化させて遺伝性QT延長症候群の心筋イオンチャネルの機能異常の性質を明らかにした。患者体細胞から iPS 細胞を樹立し心筋に分化させた胚葉体（Embryoid Body:EB）を作成した。多電極格子（Multi-electrode array:MEA）を用いてEBの細胞外電位を観察して不整脈の発生様式を観察し、種々のイオンチャネル作動薬の効果を検討した。その結果、遺伝性不整脈の病態の解明と治療法の探索には、iPS細胞を用いた解析が有用であることが判明した。

研究成果の概要（英文）：This study thus sought to better characterize ion channel cardiac disorders in Long QT Syndrome (LQT) using induced pluripotent stem cells (iPSCs). We reprogrammed somatic cells from a patient with sporadic LQTS and from controls, and differentiated them into cardiomyocytes through embryoid body (EB) formation. Electrophysiological analysis of the LQTS-iPSC-derived EBs using a multi-electrode array (MEA) system revealed a markedly prolonged field potential duration (FPD). The IKr blocker E4031 significantly prolonged FPD in control- and LQTS-iPSC-derived EBs and induced frequent severe arrhythmia only in LQTS-iPSC-derived EBs. The IKs blocker chromanol 293B did not prolong FPD in the LQTS-iPSC-derived EBs, but significantly prolonged FPD in the control EBs, suggesting the involvement of IKs disturbance in the patient. This study demonstrated that iPSCs could be useful to characterize LQTS disease as well as drug responses in the LQTS patient with a novel mutation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：心臓電気薬理

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：薬剤誘発性・QT延長症候群・イオンチャネル・iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

ごく一般的な薬物の使用により、主たる

薬効とは無関係に心電図QT時間が延長し致死性不整脈を招くことがよく知られている。この薬物誘発性QT延長症候群は、徐脈、房室ブロック、電解質異常などに伴って発症することが多い。しかしながらその発症には個人差が多く、これら環境因子のみでは説明できない点が多い。個人差が生じる説明として、心筋Kチャンネル(IKr, IKs)あるいはNaチャンネルの遺伝子変異、SNPなどのイオンチャンネル遺伝子異常が潜在的なイオンチャンネル機能障害をもたらしており、徐脈、房室ブロック、電解質異常など環境因子の変化によりチャンネル機能障害が顕在化すると推定されている。しかしながら、現在行われている、異常チャンネル遺伝子の発現電流に対する機能解析やそれに基づく薬物チャンネル相互作用の3次元的シミュレーションモデル解析の手法では、この仮説を検証できるに至っていない。

ヒト培養心筋細胞は入手することが困難であり、これを用いた不整脈、心不全の研究はこれまでできなかった。京都大学山中らの技術によりヒト線維芽細胞からiPS細胞を樹立することが可能となった(Cell 2007)。慶應義塾大学福田らはさらにヒト皮膚線維芽細胞からiPS細胞を樹立しさらに心筋細胞への分化誘導にも成功している。本研究では、遺伝性致死性不整脈疾患患者からヒトiPS細胞を樹立し、分化誘導した心筋細胞を用いて遺伝性不整脈の病態解明と薬物等によるテーラーメイド治療に挑戦する。健常者や遺伝子疾患を有する心疾患患者のヒト心筋細胞の電気生理学および収縮特性の解析ができれば、これらの心疾患の病態解明と治療法の開発が飛躍的に進歩することになる。本邦で樹立されたiPS細胞は、再生医療、疾患研究、創薬など臨床応用に向けて幅広く活用されることが期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、健常人と遺伝性QT延長症候群(LQT1、LQT2、LQT3、LQT7)患者から樹立したiPS細胞株から心筋細胞を分化誘導してQT延長を示す薬物を作用させ、遺伝子異常による潜在的イオンチャンネル機能障害と薬物の相互作用の解析から、薬物誘発性QT延長症候群の病態解明とその予防

・治療法を探索する。

3. 研究の方法

(1) 健常者および遺伝性QT延長症候群(LQT1)患者からのiPS細胞の樹立(福田)

福田らはヒト健常者皮膚線維芽細胞からのiPS細胞の樹立に成功しており、遺伝性QT延長症候群(LQT)からのiPS細胞樹立のめどはついている。いずれも、イオンフォームドコンセンスト取得症例の皮膚をバイオプシー線維芽細胞を株化した後にウイルスベクターを用いて、Oct3/4、Klf4、Sox2、c-Mycの4因子あるいはc-Mycを除いた3因子を遺伝子導入し、iPS細胞を樹立する。多能性を示す細胞コロニーを選別し実験に供する。

(2) ヒトiPS細胞からの心筋細胞誘導

既に確立しているヒトES細胞から心筋細胞を分化させる方法を用いて、ヒトiPS細胞を作成する。すなわち、NogginにてヒトiPS細胞から心筋前駆細胞へ誘導しX因子にて心筋前駆細胞から心筋細胞を誘導する。

(3) ヒトiPS細胞由来心筋細胞を使用した電気生理学的実験

①MEA (multi-electrode array) による細胞外電位測定
拍動する胚様体をMEAセンサー上におき電位を記録。多細胞標本の総和であるfield potential (FP) を反映する。不整脈の発生やFPの長さ(活動電位持続時間に相当)、カテコラミンやβブロッカーによる修飾、調整の様子を観察する。

②健常者および遺伝性QT延長症候群患者(LQT1)iPS細胞由来の心筋細胞を用いて、活動電位、イオン電流を測定する。すなわち、活動電位波形の諸指標(活動電位持続時間とその頻度依存性、静止膜電位、振幅等)、INa、ICaL、IKr、IKs、IK1、Ito、IKACH、IKATPなど多種イオンチャンネル電流を測定する。

4. 研究成果

本研究計画の実施期間である平成22年度から24年度までに、①健常者および遺伝性QT延長症候群(LQT1)患者からのiPS細胞の樹

立 ②ヒト iPS 細胞からの心筋細胞誘導 ③
 このヒト iPS 細胞由来の心筋細胞を用いた
 MEA (multi-electrode array) による細胞外
 電位測定とそれに対する薬物の反応に関す
 る実験を行った。その結果、LQT1 患者由来の
 心筋細胞標本にて IKr チャネル阻害剤と IKs
 チャネル阻害剤の作用が臨床的薬効を反映
 していることを示した (図 1)。またこのチャ
 ネル (1893delC) 遺伝子を HEK 細胞に発現さ
 せ、パッチクランプにて IKs 電流が
 dominant-negative 様に抑制されること、免疫
 染色によりその原因がトラフィッキング異
 常に基づくことを解明し Cardiovascular
 Research (2012、Egashira ら)に報告した。
 また、LQT7 (Anderson 症候群) にも同様な
 検討を行い、特徴的な細胞内 Ca 動態を介し
 た不整脈発生様式について知見を得ている
 (図 2)。

パッチクランプ法による活動電位波形や
 イオン電流の観察と薬物による修飾作用の
 解析については、現在主として標本の作成上
 の問題で難航している。すなわち、ヒト iPS
 細胞由来の心筋細胞塊から細胞を単離する
 際に酵素処理による細胞のダメージが強く、
 良好なイオン電流が観察されていない。その
 結果、当初の研究計画で予定していた、チャ
 ネルと薬物分子の 3 次元的ドッキングモデル
 と、活動電位、心電図波形 (QT) のシミュレ
 ーションについては実施することができな
 かった。

今回の研究成果により、ヒト疾患由来 iPS
 細胞技術により、重篤な先天性心疾患の機能
 異常と発症メカニズムの解明、増悪因子や治
 療薬剤スクリーニングのためのスキームを
 in vitro で確立できる可能性が示唆された。
 さらに疾患の増悪環境因子を同定し、患者ご
 との疾患の特性に呼応した個別化医療を理
 論的に可能にするなど、新しい治療法の可
 能性が示唆された。

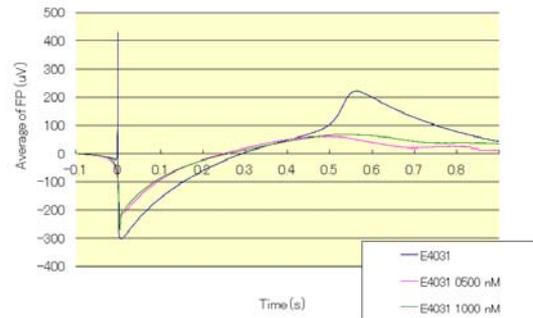


図 1. E-4031 の効果。LQT1 患者 iPSC 細胞由来
 心筋細胞塊の擬似 QT 時間は、E-4031 (IKr 阻
 害剤) にて延長した。

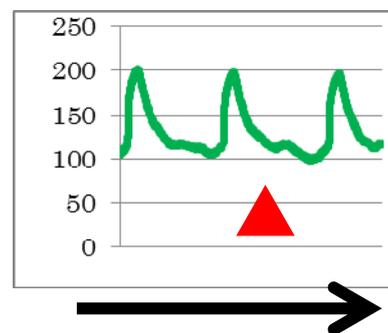


図 2. 細胞内 Ca²⁺濃度。LQT7 (Andersen 症候
 群) 患者の iPSC 細胞由来心筋細胞の Ca トラ
 ンジェントにはノッチが出現する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
 は下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① SUZUKI Tomoyuki, MORISHIMA Mikio, KATO
 Sara, UEDA Norihiro, HONJO
 Haruo, KAMIYA Kaichiro: Atrial
 selectivity in Na⁺ channel blockade by
 acute amiodarone. Cardiovascular
 Research
 98: 136-144, 2013. 査読有
 DOI: 10.1093/cvr/cvt007
- ② Yamanaka Takeshi 他: Single camera
 system for multi-wavelength
 fluorescent imaging in the heart. Conf
 Proc IEEE Eng Med Biol Soc.2012:
 3716-3719, 2012. 査読有
 DOI: 10.1109/EMBC.2012.6346774.

- ③ EGASHIRA Toru, YUASA Shinsuke, SUZUKI Tomoyuki, AIZAWA Yoshiyasu, YAMAKAWA Hiroyuki, MATSUHASHI Tomohiro, OHNO Yohei, TOHYAMA Shugo, OKATA Shinichiro, SEKI Tomohisa, KURODA Yusuke, YAE Kojiro, HASHIMOTO Hisayuki, TANAKA Tomofumi, HATTORI Fumiyuki, SATO Toshiaki, MIYOSHI Shunichiro, TAKATSUKI Seiji, MURATA Mitsushige, KUROKAWA Junko, FURUKAWA Tetsushi, MAKITA Naomasa, AIBA Takeshi, SHIMIZU Wataru, HORIE Minoru, KAMIYA Kaichiro, 他 3 名: Disease characterization using LQTS-specific induced pluripotent stem cells. Cardiovascular Research 95(4): 419-429, 2012. 査読有 DOI:10.1093/cvr/cvs206

[学会発表] (計 8 件)

- ① NIWA Ryoko: The effects of IK1 blockade on the dynamics of spiral wave reentry in ventricles of isolated rabbit hearts. 第 90 回日本生理学会大会、2013 年 3 月 29 日、東京
- ② SUZUKI Tomoyuki: Atrial selectivity in sodium channel block by amiodarone. Biophysical Society 57th Annual Meeting, 2013 年 2 月 3 日、Philadelphia, USA
- ③ 黒田裕介: ヒト iPS 細胞を用いた遺伝性不整脈疾患モデルの作成と病態解明. 第 37 回東海不整脈研究会、2012 年 9 月 15 日、名古屋
- ④ 丹羽良子: IK1 遮断が心室筋の活動電位とスパイラル・リエントリーに及ぼす作用. 第 139 回日本循環器学会東海地方会、2012 年 7 月 7 日、浜松

- ⑤ EGASHIRA Toru: Disease characterization using long QT syndrome-specific induced pluripotent stem cells. American Heart Association Scientific Sessions 2011, 2011 年 11 月 12 日、Orlando, USA
- ⑥ SUZUKI Tomoyuki: Atrial selectivity in sodium channel block by amiodarone. ESC Congress 2011, 2011 年 08 月 27 日、Paris, France
- ⑦ SUZUKI Tomoyuki: Atrial selectivity in sodium channel block by amiodarone.

the Japanese Circulation Society, 2011 年 08 月 03 日、横浜

- ⑧ KAMIYA Kaichiro: Molecular analysis of long QT syndromes type 1 patient specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte. The 75th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society Special Session (招待講演)、2011 年 08 月 03 日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹羽 良子 (NIWA RYOKO)
名古屋大学・環境医学研究所・研究員
研究者番号: 00216467

(2) 研究分担者

神谷 香一郎 (KAMIYA KAICHIRO)
名古屋大学・環境医学研究所・教授
研究者番号: 50194973