

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790848

研究課題名（和文） 遺伝性不整脈疾患の病態解明－疾患特異的ヒト iPS 細胞を用いた解析

研究課題名（英文） Genetic backgrounds of inherited arrhythmias -disease specific human iPS cells-

研究代表者

牧山 武 (MAKIYAMA TAKERU)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：30528302

研究成果の概要（和文）：

カテコラミン誘発性多形性心室頻拍（CPVT）は、運動や情動などのカテコラミン刺激によって、心室頻拍・細動による突然死を引き起こす遺伝性不整脈疾患である。我々は、リアノジン受容体（RyR2）遺伝子異常が同定されている CPVT 患者より、ヒト人工多能性幹（iPS）細胞を作製し分化心筋の解析を行った。電氣的ペーシング下に Ca transient 測定を行ったところ、CPVT 患者由来分化心筋では、健常人由来分化心筋に比べて、カテコラミン負荷後に拡張期細胞内 Ca 増加（diastolic Ca wave）を生じる細胞が有意に多かった。本研究にて、CPVT の病態を細胞レベルで一部再現でき、今後、薬効評価などの疾患モデルとしての有用性が期待される。

研究成果の概要（英文）：

Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT) is an inherited disorder characterized by adrenergically mediated ventricular tachyarrhythmias which cause syncope and sudden death without structural heart diseases. We generated disease-specific iPS cells from a patient associated with CPVT. The differentiated cardiomyocytes had an increased susceptibility to catecholamine-induced calcium waves. Our results suggest that the differentiated myocytes from the patient could be a useful model of CPVT enabling us to investigate the disease causing mechanisms and develop new therapies.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

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：不整脈、分子心臓病態学

1. 研究開始当初の背景

本邦では年間 5-10 万人が心臓突然死をきたしていると推測され、近年、社会でも不整脈と心臓突然死にかかわる関心が急速に高まってきている。致死性不整脈の原因としては、明らかな基礎疾患がないにも関わらず心室細動を来し、突然死に至る例も存在し、

遺伝子異常の関与が報告されている。2007 年、京都大学 iPS 細胞研究所、山中らが開発したヒト iPS 細胞 (Takahashi et al. *Cell* 131:861-872.2007) を用いることにより、患者の皮膚から、患者自身の心筋細胞を作製し、解析することが可能となり、疾患の病態解明、再生治療への応用が注目されている。

2. 研究の目的

カテコラミン誘発性多形性心室頻拍 (CPVT) は、運動や情動などのカテコラミン刺激によって、心室頻拍・細動による突然死を引き起こす遺伝性不整脈疾患である。原因遺伝子として約 50-60%に筋小胞体からの Ca 放出に関わるリアノジン受容体 (RyR2) 遺伝子異常が検出される。今回、CPVT の病態解明を目的とし、患者よりヒト人工多能性幹 (induced pluripotent stem: iPS) 細胞を作製し分化心筋の解析を行った。

3. 研究の方法

運動時の失神既往、二方向性心室頻拍を認め、RyR2 遺伝子異常 (p. I4587V) が検出されている CPVT 患者において、皮膚を採取し、皮膚線維芽細胞を樹立した。ヒト iPS 細胞の作製は、高橋、山中らの方法 (Cell 131: 861-872) を用い、レトロウイルスにて以下の 4 遺伝子 (OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC) を導入し、iPS 細胞を得た。心筋分化は胚様体形成法 (Yang et al. Nature 2008) にて行った。心筋分化後、3 か月の分化心筋を酵素処理後、単一細胞になるように dish に接着させた。Ca imaging dye として Fluo-8 を用い、単一心筋細胞の Ca transient を計測した (AQUACOSMOS, 浜フォト)。計測は、15sec ずつ、rate 30、60/分にて電氣的ペースングを行い、イソプロテレノール 100nM 負荷後、同様に電氣的ペースングを行い記録した。

(倫理面への配慮)

本研究は、京都大学医学部の倫理委員会にて承認済みである。

4. 研究成果

単一分化心筋細胞の Ca transient 測定波形を示す。図 1 は、健常人 iPS 細胞由来分化心筋 (201B7) の結果であるが、頻拍ペースング下、イソプロテレノール負荷にても拡張期細胞内 Ca 増加 (diastolic Ca wave) を認めなかった。

図 1 健常人 iPS 細胞由来分化心筋の Ca transient 記録 (赤矢印はペースングトリガー)

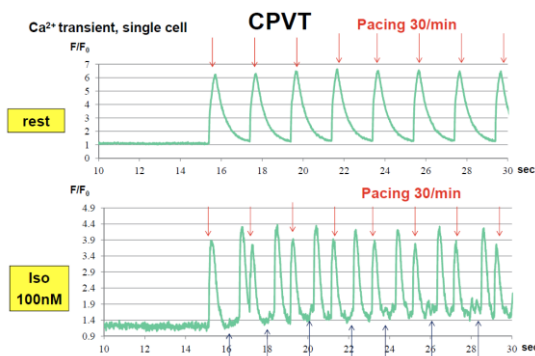


図 2 CPVT-iPS 細胞由来分化心筋の Ca transient 記録 (赤矢印はペースングトリガー、黒矢印はdiastolic Ca wave)

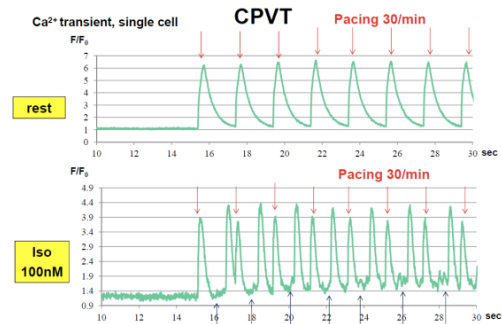


図 2 に CPVT-iPS 細胞由来心筋細胞の Ca transient 代表波形を示す。下段の青矢印のようにイソプロテレノール負荷後、拡張期細胞内 Ca 増加 (diastolic Ca wave) を認め、それに伴う triggerd activity も観察された。

統計解析にて、CPVT-iPS 細胞由来分化心筋では、イソプロテレノール負荷後、diastolic Ca wave を認める細胞が有意に多かった。(図 3) (CPVT 55% (n=31) v.s. コントロール 22% (n=36), pacing rate 30/min, p=0.02, CPVT 50% (n=34) v.s. コントロール 19% (n=43), pacing rate 60/min, p=0.01)

本研究にて、RyR2 遺伝子異常を持つ CPVT 患者から疾患特異的ヒト iPS 細胞を作製した。Ca diastolic wave は、CPVT model mice にてもみられる現象であり、CPVT の心筋細胞レベルの phenotype が再現できていると考えられた。

本研究にて CPVT 患者 iPS 細胞由来分化心筋にて細胞レベルの病態を一部再現できた。本モデルはさらなる病態解明や薬効評価に役立つと期待される。

現在、本モデルにおいて、各抗不整脈の薬効評価を進めている。

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 14 件)

- ① Kamakura T, Makiyama T, Sasaki K, Yoshida Y, Wuriyanghai Y, Chen J, Hattori T, Ohno S, Kita T, Horie M, Yamanaka S, Kimura T. Ultrastructural Maturation of Human-Induced Pluripotent Stem

- Cell-Derived Cardiomyocytes in a Long-Term Culture. *Circ J*. 2013 Feb 9.
- ② Villafañe J, Atallah J, Gollob MH, Maury P, Wolpert C, Gebauer R, Watanabe H, Horie M, Anttonen O, Kannankeril P, Faulkner B, Bleiz J, Makiyama T, Shimizu W, Hamilton R, Young ML. Long-Term Follow-Up of a Pediatric Cohort With Short QT Syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Jan 25.
 - ③ Ishikawa T, Takahashi N, Ohno S, Sakurada H, Nakamura K, On YK, Park JE, Makiyama T, Horie M, Arimura T, Makita N, Kimura A. Novel SCN3B Mutation Associated With Brugada Syndrome Affects Intracellular Trafficking and Function of Nav1.5. *Circ J*. 2012 Dec 21.
 - ④ Hattori T, Makiyama T, Akao M, Ehara E, Ohno S, Iguchi M, Nishio Y, Sasaki K, Itoh H, Yokode M, Kita T, Horie M, Kimura T. A novel gain-of-function KCNJ2 mutation associated with short QT syndrome impairs inward rectification of Kir2.1 currents. *Cardiovasc Res*. 2012 Mar 15;93(4):666-73.
 - ⑤ Kimura H, Zhou J, Kawamura M, Itoh H, Mizusawa Y, Ding WG, Wu J, Ohno S, Makiyama T, Miyamoto A, Naiki N, Wang Q, Xie Y, Suzuki T, Tateno S, Nakamura Y, Zang WJ, Ito M, Matsuura H, Horie M. Phenotype variability in patients carrying KCNJ2 mutations. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012 Jun;5(3):344-53.
 - ⑥ Watanabe H, Nogami A, Ohkubo K, Kawata H, Hayashi Y, Ishikawa T, Makiyama T, Nagao S, Yagihara N, Takehara N, Kawamura Y, Sato A, Okamura K, Hosaka Y, Sato M, Fukae S, Chinushi M, Oda H, Okabe M, Kimura A, Maemura K, Watanabe I, Kamakura S, Horie M, Aizawa Y, Shimizu W, Makita N. Clinical characteristics and risk of arrhythmia recurrences in patients with idiopathic ventricular fibrillation associated with early repolarization. *Int J Cardiol*. 2012 Sep 6;159(3):238-40.
 - ⑦ Hattori T, Makiyama T, Akao M, Ehara E, Ohno S, Iguchi M, Nishio Y, Sasaki K, Itoh H, Yokode M, Kita T, Horie M, Kimura T. A novel gain-of-function KCNJ2 mutation associated with short-QT syndrome impairs inward rectification of Kir2.1 currents. *Cardiovasc Res*. 2012 Mar 15;93(4):666-73.
 - ⑧ Makita N, Seki A, Sumitomo N, Chkourko H, Fukuhara S, Watanabe H, Shimizu W, Bezzina CR, Hasdemir C, Mugishima H, Makiyama T, Baruteau A, Baron E, Horie M, Hagiwara N, Wilde AA, Probst V, Le Marec H, Roden DM, Mochizuki N, Schott JJ, Delmar M. A connexin40 mutation associated with a malignant variant of progressive familial heart block type I. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2012 Feb 1;5(1):163-72.
 - ⑨ Watanabe H, Nogami A, Ohkubo K, Kawata H, Hayashi Y, Ishikawa T, Makiyama T, Nagao S, Yagihara N, Takehara N, Kawamura Y, Sato A, Okamura K, Hosaka Y, Sato M, Fukae S, Chinushi M, Oda H, Okabe M, Kimura A, Maemura K, Watanabe I, Kamakura S, Horie M, Aizawa Y, Shimizu W, Makita N. Electrocardiographic characteristics and SCN5A mutations in idiopathic ventricular fibrillation associated with early repolarization. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2011 Dec;4(6):874-81.
 - ⑩ Miyamoto A, Hayashi H, Yoshino T, Kawaguchi T, Taniguchi A, Itoh H, Sugimoto Y, Itoh M, Makiyama T, Xue JQ, Murakami Y, Horie M. Clinical and electrocardiographic characteristics of patients with short QT interval in a large hospital-based population. *Heart Rhythm*. 2012 Jan;9(1):66-74.
 - ⑪ Tsuji-Wakisaka K, Akao M, Ishii TM, Ashihara T, Makiyama T, Ohno S, Toyoda F, Dochi K, Matsuura H, Horie M. Identification and functional characterization of KCNQ1 mutations around the exon 7-intron 7 junction affecting the splicing process. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Nov;1812(11):1452-9.
 - ⑫ Doi T, Makiyama T, Morimoto T, Haruna Y, Tsuji K, Ohno S, Akao M, Takahashi Y, Kimura T, Horie M. A novel KCNJ2 nonsense mutation, S369X, impedes trafficking and causes a limited form of Andersen-Tawil syndrome. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011 Jun;4(3):253-60.

- ⑬ Ohno S, Zankov D, Ding W, Makiyama T, Doi T, Shizuta S, Itoh H, Nishio Y, Hattori T, Matsuura H, Horie M. KCNE5 (KCNE1L) variants are novel modulators of Brugada syndrome and idiopathic ventricular fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2011 Jun;4(3):352-61.
- ⑭ 牧山武 循環器疾患の発症機序解明における iPS 細胞の可能性 循環器内科 2011 70(5): 530-536

[学会発表] (計 14 件)

- ① 牧山武: Phenotypic characteristics between SCN5A and LMNA mutation carriers in familial bradyarrhythmic disorders. The 5th Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHS) Scientific Session, Taipei, Taiwan, 10.3-6, 2012.
- ② 牧山武: Disease Modeling in Human Induced Pluripotent Stem Cells -Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia-, 第 77 回日本循環器学会学術集会, 横浜, 3.15-17, 2013.
- ③ 鎌倉 令: One-year assessment of the ultrastructural changes of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, European Society of Cardiology (ESC) Congress, Munich, Germany, 8.25-29, 2012.
- ④ 鎌倉 令: Genetic Backgrounds in Patients with Early-Onset and Familial Atrial Fibrillation, The 5th Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHS) Scientific Session, Taipei, Taiwan, 10.3-6, 2012.
- ⑤ 佐々木 健一: One Year Assessment of Ion Channel Gene Expression in Cardiomyocytes derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells, The 5th Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHS) Scientific Session, Taipei, Taiwan, 10.3-6, 2012.
- ⑥ 佐々木 健一: 0 Ca²⁺ Imaging of Cardiomyocytes Differentiated from Human Induced Pluripotent Stem Cells in Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia, 第 77 回日本循環器学会学術集会, 横浜, 3.15-17, 2013.
- ⑦ 佐々木 健一: One Year Assessment of Ion Channel Gene Expression in Cardiomyocytes derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells, 第 77 回日本循環器学会学術集会, 横浜, 3.15-17, 2013.

- ⑧ Yimin Wuriyanghai: Identification of Cardiomyocytes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells using a Cardiac Specific Lentiviral Vector, 第 77 回日本循環器学会学術集会, 横浜, 3.15-17, 2013.
- ⑨ 牧山武: Analysis of Cardiomyocytes Differentiated from Disease-specific Induced Pluripotent Stem Cells from a Patient with Lamin A/C-related Cardiomyopathy. American Heart Association, Orland, USA, 11.16, 2011.
- ⑩ 牧山武: Analysis of Cardiomyocytes Differentiated from Disease-specific Induced Pluripotent Stem Cells from a Patient with Lamin A/C-related Cardiomyopathy. 第 76 回日本循環器学会学術集会, 福岡, 3.16-18, 2012.
- ⑪ 牧山武: Establishment of Disease-specific Induced Pluripotent Stem Cells from a Patient with Lamin A/C-related Cardiomyopathy. 第 75 回日本循環器学会学術集会, 横浜, 8.3-4, 2011.
- ⑫ 服部 哲久: Genetic Analysis of Candidate Gene Mutations in Patients with Short QT Syndrome. 第 76 回日本循環器学会学術集会, 福岡, 3.16-18, 2012.
- ⑬ 服部 哲久: Over-expression of heterozygous KCNJ2-M301K channels, identified in a patient with short QT syndrome, 第 76 回日本循環器学会学術集会, 福岡, 3.16-18, 2012.
- ⑭ 鎌倉 令: ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の電子顕微鏡所見, 第 33 回心筋生検研究会, 京都, 11.25-26, 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧山 武 (MAKIYAMA TAKERU)
 京都大学・医学研究科・助教
 研究者番号: 30528302