

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461117

研究課題名(和文) ヒトiPS心筋細胞を用いた遺伝性不整脈疾患の新たな機序の解明と治療への応用

研究課題名(英文) Identification of the mechanisms for hereditary arrhythmic disease using human iPS cell technology

研究代表者

村田 光繁 (Murata, Mitsushige)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30317135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ベプリジルを中心とした抗不整脈薬のヒトiPS心筋細胞の電気生理学的特性に対する効果を検討した。未分化ヒトiPS細胞においてSCN5A、CACNA1G、HCN4 mRNAの発現が確認された。ヒトiPS心筋細胞に対するベプリジルの効果検討では、SCN5A、CACNA1、CACNA1G、HCN4発現を濃度依存的に増加し、ベプリジルは未分化時の発現量のそれぞれ3倍、4倍、2倍、6倍に増加した。一方、KCNQ1はほとんど変化を認めなかった。これはベプリジルの抗不整脈効果に差が出る可能性を示唆し、ベプリジルの薬物効果発現の機序として、慢性期効果は重要な所見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that human induced pluripotent stem (iPS) cell technology is useful for disease specific in vivo cell model and drug screening. Since many kinds of ion channels express in the cardiomyocytes, it is desirable to investigate the effects of anti-arrhythmic drugs on electrophysiological properties in native cardiomyocytes. In this study, first, we have succeeded in the induction of human iPS cell derived cardiomyocytes. QT PCR analyses revealed the expression of several ion channels such as SCN5A, CACNA1G, HCN4 in undifferentiated human iPS cells. Second, we investigated the effects of Bepridil on ion channel expression in human iPS cell derived cardiomyocytes. Bepridil dose dependently increased the expression of SCN5A, CACNA1, CACNA1G, HCN4. These results indicated that Bepridil may modulate ion channel expression in cardiomyocytes, resulting in the chronic effects of Bepridil in addition to the acute direct effect on the ion channels.

研究分野：循環器

キーワード：心臓 再生医療 不整脈

1. 研究開始当初の背景

家族性突然死症候群のうち、遺伝性 QT 延長症候群やブルガダ症候群等のイオンチャネルの遺伝子変異により惹起される遺伝性致死性不整脈は、若年者の突然死を惹起する予後不良の疾患であり治療法開発が喫緊の課題である。これら遺伝性不整脈疾患の治療法の開発にはその電気生理学的特性を解析する必要があるが、特に心筋細胞の電気生理学的特性は種依存性的に多種多様であり、ヒト心筋細胞を用いて解析することが望まれる。しかし、これまで培養ヒト心筋細胞は入手すること自体が困難であり、これを用いた電気生理学的研究は不可能であった。健常者およびイオンチャネルに遺伝子変異を有する疾患患者のヒト心筋細胞の電気生理学的解析が可能になれば、これらの症例の治療法を見出すことが出来るようになり、遺伝子変異ごとのテーラーメイド医療への道が開かれることになる。さらに iPS 技術は特にヒト心筋細胞を再現可能であり、より疾患に近い状態での研究が可能である。

2. 研究の目的

家族性突然死症候群のうち、イオンチャネルの遺伝子変異により惹起される遺伝性致死性不整脈は、若年者の突然死を惹起する予後不良の疾患であり治療法開発が喫緊の課題である。本研究では、健常者および遺伝子致死性不整脈患者から iPS 細胞を樹立し、これを心筋細胞に分化誘導し活動電位やイオン電流を直接計測し、変異イオンチャネル特異的あるいは遺伝子変異部位特異的な電気生理学的特性を病態解析するとともに、薬剤反応性を検討することによりこれらの疾患に対する治療法開発をめざすことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) iPS 細胞の樹立

インフォームドコンセント (IC) 取得症例の皮膚および血液から Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc の 4 因子あるいは c-Myc を除く 3 因子を遺伝子導入し、iPS 細胞を樹立する。細胞 5000 個あたり 1 コロニーが出現するが、多数のコロニーをピックアップし、このうち多能性を有するコロニーを選別し実験に使用する。

(2) ヒト iPS 細胞から心筋細胞の誘導および精製

これまで我々はヒト ES 細胞から心筋前駆細胞を分化誘導する因子として Noggin を、心筋前駆細胞から心筋細胞を分化誘導する方法として G-CSF を同定した。我々は分化早期の幼若心筋細胞は細胞分裂能を有するが、この時期の心筋細胞に特異的に発現する受容体を発見し、そのリガンド G-CSF で幼若心筋細胞を刺激すると盛んに細胞分裂することを見出した。これらの技術をヒト ES 細胞

に応用すると、効率的に心筋細胞が分化誘導できることを確認している。本研究に先立つ予備実験では、ヒト iPS 細胞も ES 細胞と同様に心筋細胞を分化誘導できることを確認した。本研究ではヒト iPS 細胞を効率的に心筋細胞に分化誘導出来る条件を確立する。

(3) 抗不整脈薬のヒト iPS 心筋細胞のイオンチャネル発現に対する作用

抗不整脈薬は、チャネルに直接作用しその電気生理学的特性を変化させる。一方、抗不整脈薬の中にはチャネルへの直接作用だけでなく、チャネルの膜へのトラフィッキングやユビキチン化などの翻訳後修飾の効果も有しているものがある。そこで、multichannel modulator であるアミオダロン、ベプリジル、キニジンなどの抗不整脈薬をヒト iPS 心筋に投与し、3 日後、1 週間後、2 週間後で活動電位記録、イオンチャネル電流記録および遺伝子発現量解析などの詳細な検討を行う。

4. 研究成果

(1) ヒト iPS 細胞樹立および心筋分化誘導

従来の ES 細胞における心筋分化と同様にヒト iPS 細胞の心筋分化誘導を確立した。さらに、健常人に加えて数種類の遺伝性不整脈患者の iPS 細胞を樹立した。特に遺伝性 QT 延長症候群は、全体の約 7 割を I 型、II 型、III 型が占めるがこれらすべての症例について iPS 細胞を作成した。

(2) 薬剤によるヒト iPS 細胞におけるイオンチャネル遺伝子発現修飾作用

ベプリジルを中心とした抗不整脈薬のヒト iPS 心筋細胞の電気生理学的特性に対する効果を検討した。山中 3 因子および 4 因子をレトロウイルスベクターを用いてヒト線維芽細胞に導入することによりヒト iPS 細胞を樹立し、未分化 iPS 細胞において SCN5A、CACNA1G、HCN4 mRNA の発現が確認された。ヒト iPS 心筋細胞に対するベプリジルの効果検討では、SCN5A、CACNA1、CACNA1G、HCN4 発現を濃度依存的に増加し、ベプリジルは未分化時の発現量のそれぞれ 3 倍、4 倍、2 倍、6 倍に増加した。一方、KCNQ1 はほとんど変化を認めなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 26 件)

- (1) Shiraishi Y, Kohno T, Fujii-Nishimura Y, Shimoda M, Ikeda Y, Nakajima K, Nishiyama T, Nishiyama N, Murata M, Maekawa Y, Sano M, Fukuda K: Endomyocardial fibrosis: missing tricuspid valve and Fontan-like circulation. Heart Vessels. 2016 (査読あ

- り)(Epub ahead of print: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26747439>)
- (2) Tokuda H, Murata M, Yashima F, Kudo M, Yasuda R, Tsuruta H, Okamoto K, Maekawa Y, Sano M, Fukushima H, Shimizu H, Fukuda K: Periodic protrusion of right coronary cusp into left ventricular outflow tract due to detachment from the aortic annulus complicated with infective endocarditis. *Echocardiography* 33. 655-658. 2016 (査読あり). doi: 10.1111/echo.13157
- (3) Kimura M, Kohno T, Murata M, Sugihara K, Nishiyama T, Tsuruta H, Maekawa Y, Nakahara T, Sano M, Fukuda K: Oral nitrate administration ameliorates cardiogenic shock due to eclipsed mitral regurgitation. *Cardiology* 134. 327-330, 2016 (査読あり) doi: 10.1159/000444182
- (4) Kanazawa H, Kawamura A, Kimura M, Akita K, Yashima F, Arai T, Kawakami T, Hayashida K, Tsuruta H, Yuasa S, Itabashi Y, Murata M, Maekawa Y, Fukuda K: A novel wire-assisted technique for closing large atrial septal defects. *JACC Cardiovasc Interv* 28. E59-e61, 2016 (査読あり). doi: 10.1016/j.jcin.2015.12.016.
- (5) Kitahara H, Murata M, Okamoto K, Kudo M, Yoshitake A, Tsuruta H, Itabashi Y, Fukuda K, Yozu R, Shimizu H: Preservation of mobility of the posterior mitral leaflet after mitral valve repair with Neochordae using loop technique. *Circulation Journal* 80. 663-667. 2016 (査読あり). doi: 10.1253/circj.CJ-15-0902
- (6) Isobe S, Ieda M, Kohno T, Nishiyama T, Maekawa Y, Tsuruta H, Murata M, Yashima F, Yanagisawa R, Tanaka M, Inami S, Nasuno T, Haruyama A, Sano M, Hayashida K, Fukuda K: Effective Cibenzoline treatment in a patient with midventricular obstruction after transcatheter aortic valve implantation. *Circ Heart Fail* 9. E002629. 2016(査読あり) doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.115.002629
- (7) Kimura M, Kohno T, Kawakami T, Kataoka M, Inohara T, Takei M, Tsugu T, Murata M, Maekawa Y, Fukuda K: Balloon pulmonary angioplasty attenuates ongoing myocardial damage in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Int J Cardiol* 207. 387-389. 2016.(査読あり)(doi:10.1016/j.ijcard.2015.11.026)
- (8) Yasuda R, Murata M, Roberts R, Tokuda H, Minakata Y, Suzuki K, Tsuruta H, Kimura T, Nishiyama N, Fukumoto K, Aizawa Y, Tanimoto K, Takatsuki S, Abe T, Fukuda K. Left atrial strain is a powerful predictor of atrial fibrillation recurrence after catheter ablation: study of a heterogeneous population with sinus rhythm or atrial fibrillation. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 16. 1008-1014. 2015(査読あり). doi: 10.1093/ehjci/jev028.
- (9) Tsugu T, Murata M^{**}, Kawakami T, Yasuda R, Tokuda H, Minakata Y, Tamura Y, Kataoka M, Hayashida K, Tsuruta H, Maekawa Y, Inoue S, Fukuda K. Significance of Echocardiographic Assessment for Right Ventricular Function after Balloon Pulmonary Angioplasty in Patients with Chronic Thromboembolic Induced Pulmonary Hypertension. *Am J Cardiol* 115: 256-261, 2015(査読あり). doi: 10.1016/j.amjcard.2014.10.034.
- (1 0) Yamakawa H, Murata M^{**}, Suzuki T, Yada H, Ishida H, Aizawa Y, Adachi T, Kamiya K, Fukuda K. Suppression of Rad leads to arrhythmogenesis via PKA-mediated upregulation of Ryanodine receptor activity in the heart. *Biochem Biophys Res Commun* 452: 701-707, 2014(査読あり). doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.126.
- (1 1) Seki T, Yuasa S, Kusumoto D, Kunitomi A, Saito Y, Tohyama S, Yae K, Kishino Y, Okada M, Hashimoto H, Takei M, Egashira T, Kodaira M, Kuroda Y, Tanaka A, Okata S, Suzuki T, Murata M, Fujita J, Fukuda K. Generation and characterization of functional cardiomyocytes derived from human T cell-derived induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 9: e85654, 2014 (査読あり). doi: 10.1371/journal.pone.0085645.
- (1 2) Ohno Y, Yuasa S, Egashira T, Seki T, Hashimoto H, Tohyama S, Saito Y, Kunitomi A, Shimoji K, Onizuka T, Kageyama T, Yae K, Tanaka T, Kaneda

R, Hattori F, Murata M, Kimura K, Fukuda K. Distinct iPS cells show different cardiac differentiation efficiency. *Stem Cells International* 2013 (査読あり). 659739. 2013. doi: 10.1155/2013/659739.

- (1 3) Aizawa Y, Takatsuki S, Suenaga Y, Kimura T, Nishiyama N, Fukumoto K, Tanimoto Y, Tanimoto K, Kohsaka S, Fukuda Y, Murata M, Miyoshi S, Sato T, Iwanaga S, Ogawa S, Fukuda K. Diagnostic value of portable electrocardiogram (Cardiophone) in patients complaining of palpitation. *Int J Cardiol.* 168: 2925-2927, 2013(査読あり). doi: 10.1016/j.ijcard.2013.03.182.
- (1 4) Aizawa Y, Takatsuki S, Sano M, Kimura T, Nishiyama N, Fukumoto K, Tanimoto Y, Tanimoto K, Murata M, Komatsu T, Mitamura H, Ogawa S, Funazaki T, Sato M, Aizawa Y, Fukuda K. Brugada syndrome behind complete right bundle-branch block. *Circulation.* 128: 1048-1054, 2013(査読あり). doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003472

〔学会発表〕(計 3 1 件)

- (1) Kuroda Y, Yuasa S, Watanabe Y, Hattori T, Ohno S, Egashira T, Seki T, Okata S, Tanaka A, Aizawa Y, Suzuki T, Murata M, Aiba T, Makita N, Shimizu W, Kodama I, Horie M, Horigome H, Kamiya K, Fukuda K. Pathophysiological analysis of the hereditary heart disease using iPS cells、第 79 回日本循環器学会学術集会、2015 年 4 月 25 日、大阪国際会議場 (大阪府大阪市)
- (2) Tsugu T, Murata M, Kawakami T, Yasuda R, Tokuda H, Minakata Y, Kataoka M, Hayashida K, Tsuruta H, Maekawa Y, Inoue S, Fukuda K. Significance of echocardiographic assessment for right ventricular function after balloon pulmonary angioplasty in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension、第 79 回日本循環器学会学術集会、2015 年 4 月 24 日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)。
- (3) Kuroda Y, Yuasa S, Hattori T, egashira T, Aizawa Y, Seki T, Murata M, Okata S, Ohno S, Horie M, Fukuda K, Kamiya K. Disease Modeling for Andersen-Tawil

Syndrome Using Patient-Specific iPS Cell. 第 78 回日本循環器学会学術集会、2014 年 3 月 22 日、東京国際フォーラム (東京都港区)。

- (4) Suzuki T, Yuasa S, Takei M, Murata M, Kamiya K, Fukuda K. Uncovering the Pathophysiology of Short-coupled Variant of Torsade de Pointes by Disease Specific-induced Pluripotent Stem Cells. 第 78 回日本循環器学会学術集会、2014 年 3 月 22 日、東京国際フォーラム (東京都港区)。
- (5) Furukawa T, Okata S, Yuasa S, Suzuki T, Makita N, Kurokawa J, Egashira T, Yamakawa H, Seki T, Aizawa T, Hashimoto H, Kudoda Y, Tanaka A, Yae K, Murata M, Aiba T, Shimizu W, Horie M, Kodama I, Ogawa S, Fukuda K. Disease Modeling Using iPS Cells、第 78 回日本循環器学会学術集会、2014 年 3 月 21 日、東京国際フォーラム(東京都港区)
- (6) 安田理沙子、村田光繁、鶴田ひかる、鈴木恵子、木村雄弘、福本耕太郎、相澤義泰、谷本耕司郎、高月誠司、福田恵一、心房細動に対する肺静脈隔離術後の再発予測における左房 lateral strain の意義、第 61 回日本心臓病学会、2013 年 9 月 20 日、ホテル日航熊本 (熊本県熊本市)。

〔図書〕(計 1 7 件)

(1) 村田光繁: 筋小胞体の仕事は何か?。村川裕二 (編), エクスプレス循環器病ファイル, pp54-55, メディカルサイエンスインターナショナル, 東京, 2015

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

村田 光繁 (MURATA MITSUSHIGE)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号 : 30317135