

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670110

研究課題名(和文) LQT1型iPS由来心筋を用いたHsp70による変異チャネル蛋白安定化治療

研究課題名(英文) Stabilization of KvLQT1 by Hsp70 in differentiated cardiomyocytes derived from LQT1 iPS cells

研究代表者

久留 一郎 (Hisatome, Ichiro)

鳥取大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60211504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：QT延長症候群type1型患者と健常者のTリンパ球からiPS細胞を樹立し、そのイオンチャネルの特性を電気生理学的手法ならびに生化学的手法を行い、HSP70によりそのチャネル蛋白を安定化出来るかを目的に検討した。同時にヒトES細胞由来心筋を対象として作成したLQT1型iPS細胞の心筋分化誘導に成功し、その電気特性は健常者iPS細胞由来心筋に比較して自動能性活動電位の有意な延長とKvLQT1電流であるIKs電流が有意に減少したがNa channel, Ca channel, IK1 channel, HERG channelの活性には異常を認めなかった。現在熱ショックに対する反応を検討している。

研究成果の概要(英文)：研究成果の概要(英文)：We identified the novel missense mutation M437V of KCNQ1 in a patient with QT interval prolongation (Long QT type 1: LQT1). We employed iPS cell (iPSC)-derived cardiomyocytes to investigate the electrophysiological properties of the mutant channel in LQT1 cardiomyocytes and to see effects of heat shock proteins. To generate iPSCs from the patient and a normal subject, peripheral blood T cells were reprogrammed. Differentiated cardiomyocytes from LQT1 iPSCs exhibited prolongation of action potential duration (APD), which was due to a reduction of the KCNQ1-mediated current IKs; Na⁺ and Ca²⁺ channel currents, as well as K⁺ channel currents other than IKs were comparable to those of cardiomyocytes from normal iPSCs and human ESCs. We tried to examine the heat shock, heat shock factor1 as well as heat shock protein 70 on the mutant channel properties of cardiomyocytes from LQT1 iPS cells.

研究分野：循環器内科

キーワード：疾患 iPS LQT1 熱ショック蛋白

1. 研究開始当初の背景

1) LQT1 型の現状: LQT1 型は KvLQT1 遺伝子の変異により心筋の QT 時間が延長し致死性不整脈を起こすため、その治療法の開発が急務である。**2) LQT1 型の機序としての蛋白質不安定化:** 多くの LQT1 型は KvLQT1 変異蛋白質が不安定化し、ユビキチン・プロテアソーム系 (UPS) で分解されてしまう。**3) 国内外での研究の動向および本研究の位置づけ:** KvLQT1 変異蛋白質不安定化による LQT1 型の治療は国内外で研究されているが確立されていない。その原因は従来の方法では LQT1 型の病態を再現出来ず、蛋白質不安定化の有効性が検証出来ないことにある。**4) 研究成果を踏まえた着想:** 我々はシャペロン Hsp70 の導入によりチャンネル蛋白質を安定化して LQT を改善できることを報告した (Circ Res 2011)。またチャンネルの発現を指標として ES 細胞由来ペースメーカー細胞を可視化・選別採取する技術を世界で初めて開発した (国際出版番号: PCT/JP2010/066952)。現在 LQT1 型患者から iPS 細胞の樹立に成功した (下図参照)。そこで、LQT1 型患者の iPS 細胞由来胚様体から洞結節細胞を含む特殊刺激伝導系細胞や心室固有筋細胞を可視化・選別採取し、Hsp70 による蛋白質安定化法が KvLQT1 変異蛋白質の安定性に及ぼす効果を検討する企画する。

2. 研究の目的

1) LQT1 型患者 iPS 細胞由来心筋細胞の可視化・選別採取法の確立: チャンネル等の転写領域に GFP 遺伝子を連結したレポーター遺伝子を BAC ベクターに搭載し、LQT1 より樹立した iPS 細胞株に導入後、心筋へ分化誘導し GFP により洞結節細胞を含む刺激伝導系細胞と作業心筋細胞を可視化し選別採取する。2) LQT1 型患者 iPS 細胞由来心筋チャンネル蛋白質安定性への Hsp70 の効果検討: 得られた細胞を用いて蛋白質安定化が期待される Hsp70、その誘導薬 (ゲラニールゲラニールアセトン: GGA) ならびにチャンネル活性阻害作用を持った低分子化合物である化学シャペロン (bepridil 等) の効果を検討し、生化学的ならびに電気生理学的観点からの蛋白質安定化治療の可能性を探る。

3. 研究の方法

LQT1 患者ならびに健常者の末梢血 T 細胞から iPS 細胞を Yuasa et al. の方法を用いて作成し、Suemori et al. の方法により iPS 細胞から心筋分化誘導し、同時にヒト ES 細胞からも心筋分化誘導を行い、それぞれの心筋の電気生理学的特性ならびに KvLQT1 チャンネル蛋白質の安定性をそれぞれで検討する。作業心筋と特殊心筋を選別採取するために患者ならびに健常者由来 iPS 細胞ならびにヒト ES 細胞に相同遺伝子組み換え及びゲノム編集を用いて HCN4 ならびに MLC2v の発現を GFP と

mCherry で可視化できる細胞株を樹立する。平行して患者の変異を wild KvLQT1 に導入することで HEK293 細胞に変異チャンネルを導入発現させてその蛋白質の安定性ならびに Hsp70 の効果を検討し、最後に LQT1 患者ならびに健常者 iPS 細胞ならびにヒト ES 細胞由来心筋から作業心筋を選別採取し、Hsp70 の導入ならびにそれを制御する熱ショック及び HSF-1 の導入が変異 KvLQT1 を rescue 出来るかを検討する。

4. 研究成果

1) LQT1 型 iPS 細胞の心筋分化誘導とその特性解析

先に樹立した LQT1 型患者由来 iPS 細胞株をヌードマウスに移植して、3 胚葉を有するテラトーマ形成能を指標にスクリーニングする。その後 in vitro での心筋分化誘導を行い、最も効率の良い株を 2 株選択した。並行して健常者の血液から T 細胞を得て、センダイウィルスに搭載した山中 4 因子を感染させることで、iPS 細胞コロニーを複数得た。これらの LQT1 型 iPS 細胞と健常者由来 iPS 細胞を心筋へ分化誘導した。心筋分化誘導の原理としてはヒト ES 細胞で確立した 2 段階の分化誘導法を用いた。分化誘導心筋を用いて、RT-PCR および免疫染色法による未分化マーカーの測定、心筋分化マーカーの測定を行った結果、Nkx2.5, MYH6, KCNQ1, TBX5, TNNT2 および KCNH2 の発現を認め、心筋への分化誘導が完了していることを確認した。さらに、パッチクランプ法を用いて、拍動する心筋に対しての電気生理学的特性を検討した。自動能性活動電位を測定したところ、最大拡張電位には差が無いが、活動電位持続時間の有意な延長を健常者 iPS 細胞由来心筋ならびにヒト ES 細胞由来心筋細胞との間に認めた。そこで、活動電位持続時間の延長のイオン電流機序を検討したところ KvLQT1 電流である I_{Ks} 電流は予想通りに LQT1 型 iPS 細胞由来心筋で有意に減少していたが、健常者 iPS 由来ならびにヒト ES 細胞由来心筋では差が無かった。また、Na⁺電流ならびに、Ca²⁺電流に関しては両群間で差を認めなかった。

2) LQT1 型患者由来 iPS 細胞からの各種心筋細胞の可視化・選別採取法の確立

特殊心筋を選別採取するためにヒト HCN4 遺伝子の発現制御領域に EGFP 遺伝子が発現するように、HCN4 のエクソン 1 を含む BAC の転写領域に EGFP 遺伝子を挿入した改変ヒト HCN4-BAC ベクターを作製した。作業心筋を選別採取するためにゲノム編集を用いてヒト MLC2v の転写制御下に mCherry が発現するベクターを予備実験としてヒト ES 細胞に本ベクターを導入した。これらのベクターをヒト ES 細胞に導入し、特殊心筋と作業心筋を選別

採取できるヒト ES 細胞を樹立した。心筋分化誘導後 1 ヶ月に HCN4-GFP と MLC2v-mCherry で特殊心筋と作業心筋をそれぞれ選別採取することに成功した。現在、LQT1 型患者由来 iPS 細胞と健常者由来 iPS 細胞にこのベクターを導入しそれぞれのクローンを作成中である。

3) LQT1 型患者由来変異 KvLQT1 チャネル蛋白の安定性の解析と HSP70 の導入検討

野生型と患者の変異を持った C 末端に GFP を連結した KvLQT1-GFP を KCNQ1 と共に HEK293 細胞に導入し、それぞれの発現細胞から細胞膜ならびに小胞体分画を抽出し、ウェスタンブロットにより KvLQT1 の蛋白発現を検討した。膜分画の変異 KvLQT1 蛋白の減少を認めた。さらに電気生理学的検討から I 変異 KvLQT1 由来 Ks 電流が野生型に比較して有意に減少していることが明らかとなった。

4) LQT1 型患者由来心筋細胞の電気特性に関するシュミレーションを用いた検討

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 7 件)

Sakata S, Kurata Y, Li P, Notsu T, Morikawa K, Miake J, Higaki K, Yamamoto Y, Yoshida A, Shirayoshi Y, Yamamoto K, Horie M, Ninomiya H, Kanzaki S, Hisatome I. Instability of KCNE1-D85N that causes long QT syndrome: stabilization by verapamil. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2014 Jul;37(7):853-63 (査読あり)。

Utami SB, Mahati E, Li P, Maharani N, Ikeda N, Bahrudin U, Munemura C, Hosoyamada M, Yamamoto Y, Yoshida A, Nakayama Y, Higaki K, Nanba E, Ninomiya H, Shirayoshi Y, Ichida K, Yamamoto K, Hosoya T, Hisatome I. Apoptosis induced by an uromodulin mutant C112Y and its suppression by topiroxostat. *Clin Exp Nephrol.* 2014 Sep 20. [Epub ahead of print] (査読あり)。

Iwai C, Li P, Kurata Y, Hoshikawa Y, Morikawa K, Maharani N, Higaki K, Sasano T, Notsu T, Ishido Y, Miake J, Yamamoto Y, Shirayoshi Y, Ninomiya H, Nakai A, Murata S, Yoshida A, Yamamoto K, Hiraoka M, Hisatome I. Hsp90 Prevents Interaction between CHIP and HERG Proteins to Facilitate Maturation of Wild-type and Mutant HERG Proteins. *Cardiovasc Res.* 2013 Dec 1;100(3):520-8 (査読あり)。

Kurata Y, Hisatome I, Tanida M, Shibamoto T. Effect of hyperpolarization-activated current I(f) on robustness of sinoatrial node pacemaking: theoretical study on influence of intracellular Na(+) concentration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 304(10):H1337-1351,2013 (査読あり)。

Endo R, Notsu T, Mishima M, Morikawa K, Li P, Ikeda N, Ninomiya H, Shirayoshi Y, Hisatome I. Bepridil Suppresses Apoptosis in HL-1 Cardiac Atrial Myocytes Expressing Mutant E334K cMyBPC. *Yonago Acta Med.* 2013 Dec;56(4):93-5. (査読あり)。

Morikawa K, Ikeda N, Hisatome I, Shirayoshi Y. Heterochromatin protein 1y overexpression in P19 embryonal carcinoma cells elicits spontaneous differentiation into the three germ layers. *Biochem Biophys Res Commun.* 431(2):225-231,2013 (査読あり)。

Bahrudin U, Ikeda N, Utami SB, Maharani N, Morikawa K, Li P, Sobirin MA, Hasegawa A, Sakata S, Endo R, Rifqi S, Shirayoshi Y, Yamamoto K, Ninomiya H, Hisatome I. Simultaneous treatment with azelnidipine and olmesartan inhibits apoptosis of HL-1 cardiac myocytes expressing E334k cMyBPC. *Drug Res (Stuttg).* 2013 Oct;63(10):515-20. (査読あり)。

[学会発表](計 3 件)

1. 十川達文、一ノ瀬貴史、森川久未、池田信人、白吉安昭、倉田康孝、三明淳一朗、山本一博、湯浅慎介、福田恵一、久留一郎 Electrical properties of human iPS cell-derived cardiac myocytes from the patient with long QT syndrome harboring a novel mutation of KCNQ1. 第 29 回日本不整脈学会・第 31 回日本心電学会学術集会 (2014 年 7 月 22-25 日) 東京

2. Peili Li, Yasutaka Kurata, Nani Maharani, Yuko Ishido, Juichiro Miake, Yasuaki Shirayoshi, Kazuhiro Yamamoto, Ichiro Hisatome Hsp90 Prevents Interaction between CHIP and HERG Proteins to Facilitate Maturation of Wild-type and Mutant HERG Proteins 第 78 回日本循環器学会学術集会 (2014 年 3 月 21-23 日) 東京

3. 十川達文、三明淳一朗、山本一博、白吉安昭、久留一郎 先天性 QT 延長症候群患者に由来する TiPS 細胞の樹立とその分化心筋の特性解析 第 13 回日本再生医療学会学術集会 (2014 年 3 月 4-6 日) 京都

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕
〔産業財産権〕
出願状況（計1件）

名称：多能性幹細胞由来心筋細胞の取得法
発明者：池田信人、久留一郎
権利者：鳥取大学
種類：日本国特許
番号：特願 2014-198466
出願年月日：2014年12月25日
国内外の別：国内

取得状況（計3件）

名称：新規ペースメーカー細胞
発明者：久留一郎、白吉安昭、三明淳一郎
権利者：鳥取大学
種類：日本国特許
番号：PCT/JP2010/066952
取得年月日：
国内外の別：国内

名称：新規ペースメーカー細胞
発明者：久留一郎、白吉安昭、三明淳一郎
権利者：鳥取大学
種類：特許
番号：PCT/JP2010/066952
取得年月日：
国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

新聞記事等

今回の特許成立に関して山陰放送(日時：平成27年3月2日(月)18時15分～18時56分 放送局：山陰放送 BSSテレビ 番組名：テレポート山陰 内容：ES細胞を使用した心臓ペースメーカー細胞作製ついて)に報道された。日本海新聞(平成27年3月3日)および山陰中央新報(平成27年3月19日)に報道された。

6. 研究組織

(1) 研究代表者 久留 一郎
(HISATOME ICHIRO)
鳥取大学・医学系研究科・教授
研究者番号：60211504

(2) 研究分担者 白吉 安昭
(SHIRAYOSHI YASUAKI)
鳥取大学・医学研究科・准教授
研究者番号：90249946

(3) 研究分担者 池田信人
(IKEDA NOBUHITO)
鳥取大学・医学研究科・助教
研究者番号：50620316

(4) 研究分担者 三明 淳一郎

(MIAKE JUNICHIRO)
鳥取大学・医学部・講師
研究者番号：40372677