

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870331

研究課題名(和文)疾患特異的iPS細胞を用いたQT延長症候群のメカニズムの解明と治療への応用

研究課題名(英文) Modeling and analyzing of long QT syndrome using disease-specific iPS cells

研究代表者

服部 哲久(Hattori, Tetsuhisa)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：80638932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：QT延長症候群7型(LQT-7)は、心電図のQT/QU時間延長、周期性四肢麻痺、骨格異常を三徴とした、心室性不整脈の原因となる疾患であり、KCNJ2遺伝子異常が原因である。遺伝子変異の異なるLQT-7患者3名より人工多能性幹(iPS)細胞を樹立し、分化心筋を解析した。単一細胞の活動電位解析では、活動電位持続時間と最大拡張期電位に有意差を認めなかったが、多電極アレイ解析では、LQT-7においてフレカイニドにより不規則な興奮が減少し、イソプロテレノールを投与しても異常な興奮が誘発されず、不整脈予防効果が推測された。本研究により疾患研究や薬剤効果の検討に疾患特異的iPS細胞研究の有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Long QT syndrome type 7 (LQT-7) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene, and characterized by ventricular tachyarrhythmias associated with QT/QU interval prolongation, periodic paralysis and dysmorphic features. We generated induced pluripotent stem cells (iPSCs) from three LQT-7 patients carrying the KCNJ2 different mutations, and analyzed iPSC-derived cardiomyocytes (iPS-CMs). We measured action potentials in single iPS-CMs. There are no significant difference in action potential duration at 50% and 90% repolarization, and maximum diastolic potential between LQT-7 and wild type. In multi-electrode arrays analyses, flecainide reduced ectopic activities in LQT-7-derived cardiomyocytes. In condition with flecainide pre-administration, isoproterenol did not induce arrhythmic events, which suggests that flecainide has prophylactic effect in LQT-7-derived cardiomyocytes. This study suggest that iPS-CM could be a useful model for exploring disease mechanisms and drug screening.

研究分野：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

QT 延長症候群は、心電図における QT 時間の延長を特徴とする心筋再分極過程の異常が原因と考えられており、重篤な心室性不整脈の発生によって失神や突然死をきたす遺伝性不整脈疾患である。1950 年代に最初の症例が報告され、1990 年代に初めて原因遺伝子が同定されて以降、現在までに 15 個の原因遺伝子が報告されている。

今回の研究対象である QT 延長症候群 7 型は、Andersen-Tawil 症候群とも言われ、QT/QU 間隔延長、周期性四肢麻痺、骨格異常を三徴とする疾患として 1971 年に初めて報告された (Andersen ED et al. Acta Ped Scand, 1971)。2001 年、その原因遺伝子として *KCNJ2* 遺伝子異常が初めて報告され (Plaster NM et al. Cell, 2001)、現時点では 20 以上の *KCNJ2* 遺伝子変異が同定されている。

KCNJ2 遺伝子は、Kir2.1 チャンネルをコードし、そのチャンネルは心筋再分極に重要な I_{K1} 電流を形成する。この I_{K1} 電流は、活動電位第 3 相、第 4 相において外向きカリウム電流を形成することにより、静止膜電位の維持にも関与している。そのため、このチャンネル機能の障害は活動電位形成や安定した静止膜電位に影響する。これまで *KCNJ2* 遺伝子異常による I_{K1} 電流の変化は Chinese hamster ovary (CHO) 細胞などの培養細胞に同遺伝子を強制発現させることにより解明されてきた。しかし、この方法では、心筋細胞と比較して、あまりにも I_{K1} 電流量が過剰になっているため、変異遺伝子の患者心筋細胞や心電図への影響は推測の域を出ず、十分に病態を解明できているとは言いがたい。また、CHO 細胞などの培養細胞は心筋細胞ではないため、治療に関連する薬剤の影響を評価することが困難であった。

2007 年、山中らによりヒト induced pluripotent stem cell (iPS 細胞) が樹立された (Takahashi et al. Cell 2007)。この技術を応用することにより、患者由来 iPS 細胞を作製し、様々な細胞に分化させ、解析することによって病態解明につながる研究が可能となった。つまり、iPS 細胞技術を応用し、QT 延長症候群患者から得た iPS 細胞由来心筋細胞を作製することにより、従来の方法では不可能であった、患者の心筋細胞と同様の細胞を用いた研究が可能となったのである。

2. 研究の目的

QT 延長症候群 7 型患者由来 iPS 細胞を樹立、心筋細胞に分化誘導し、その細胞の機能解析を行うことにより、新たな知見を得るとともに病態解明や治療に貢献することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

この研究は慶應義塾大学循環器内科との共同研究である。また、本研究は、慶應義塾

大学、滋賀医科大学とともに倫理委員会にて承認済みである。

(1) 患者抽出

遺伝性不整脈疾患ライブラリより QT 延長症候群 7 型患者を 3 人抽出する。

(2) iPS 細胞の樹立

抽出した QT 延長症候群 7 型患者 3 人より血液を採取する。血液を遠心分離し、CD3 抗体コーティングプレートにて培養し、活性化 T 細胞にセンダイウイルスを用いて OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC2 を導入し、iPS 細胞を樹立する。

(3) 心筋細胞への分化誘導 (胚葉体の作製)

mouse embryonic fibroblasts (MEF) フィーダー細胞上にて培養し、コロニー化した iPS 細胞をプレートより剥離し、20% fetal bovine serum を含んだ培養液にて培養する。

以下の iPS 由来心筋細胞を用いた研究は、心筋分化開始後 60-80 日経過したものをを用いる。

(4) パッチクランプ法を用いた機能解析

トリプシンを用いて、拍動する胚葉体を単一細胞に単離した後、アンホテリシン B による穿孔パッチクランプ法を用いて、自己拍動する細胞で活動電位を記録する。比較するため、1Hz でペーシングする。

(5) 多電極アレイによる解析

心筋分化誘導により作製した、自発的な拍動を観察できた胚葉体のみマルチ電極アレイプレート上に配置し、フィールドポテンシャルと拍動周期を観察する。

(6) カルシウムイメージング

単一の心筋細胞に Ca imaging dye として Fluo-4 AM を用い、1Hz で電氣的ペーシングを行い、20 秒間、共焦点顕微鏡にて Ca transient を計測した。

4. 研究成果

(1) 患者抽出、iPS 細胞の樹立

我々の研究グループが所持している遺伝性心疾患ライブラリより、以下の QT 延長症候群 7 型患者を 3 人抽出し、疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。

[症例 1] 10 歳男性。心電図にて著明な U 波、多発性心室性期外収縮を認めた。遺伝子解析の結果、*KCNJ2*-R218W を検出した。

[症例 2] 27 歳男性。心電図にて著明な U 波を認め、周期性四肢麻痺を認めた。遺伝子解析の結果、*KCNJ2*-R67W を検出した。

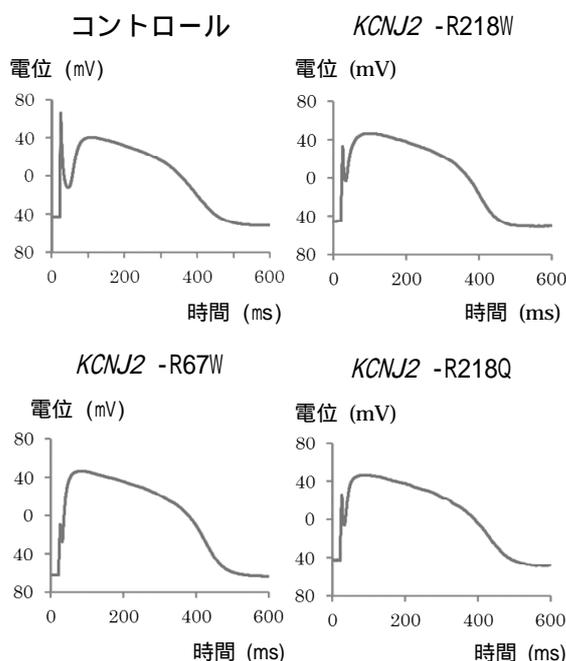
[症例 3] 47 歳男性。心電図にて著明な U 波を認め、周期性四肢麻痺を認めた。遺伝子解

析の結果、*KCNJ2*-R218Q を検出した。

(2) 活動電位の比較

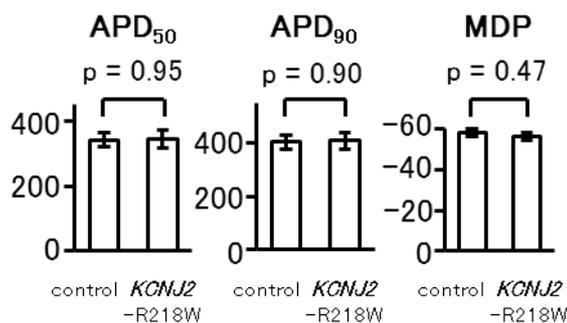
胚葉体には、心室筋タイプ、心房筋タイプ、刺激伝導系タイプの細胞が含まれている。コントロール、疾患特異的いずれにおいても、iPS 細胞株由来心筋細胞での活動電位波形は非常に多様であり、比較が困難であった。そのため、これまでの報告を参考にして、50%再分極までの活動電位持続時間 (APD₅₀)、90%再分極までの活動電位持続時間 (APD₉₀) 比が 1.1~1.3 を心室筋タイプと分類し、比較検討した。単一細胞の代表的な活動電位波形を図 1 に示す。

図 1 : 代表的な活動電位波形

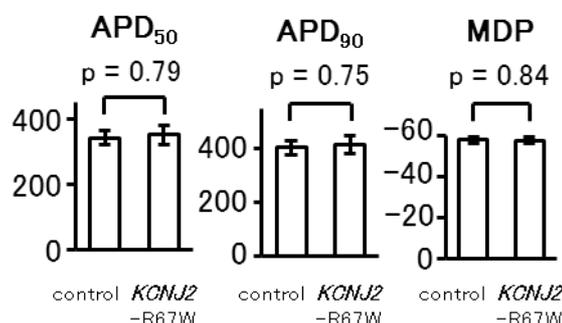


健常人 iPS 細胞由来心筋細胞 (コントロール) と疾患特異的 iPS 細胞 (*KCNJ2*-R218W、-R67W、-R218Q) 由来心筋細胞それぞれについて APD₅₀、APD₉₀、最大弛緩期電位 (MDP) を計測し、比較した。その結果、コントロール (N=13) では APD₅₀ 341.1 ± 22.8ms、APD₉₀ 403.7 ± 26.2ms、MDP -58.0 ± 2.0mV、*KCNJ2*-R218W (N=10) では APD₅₀ 343.5 ± 27.2ms、APD₉₀ 409.1 ± 30.4ms、MDP -55.9 ± 1.7mV、*KCNJ2*-R67W (N=12) では APD₅₀ 351.0 ± 29.6ms、APD₉₀ 417.2 ± 32.7ms、MDP -57.4 ± 1.5ms、*KCNJ2*-R218Q (N=6) では APD₅₀ 397.0 ± 28.9ms、APD₉₀ 490.0 ± 32.8ms、MDP -52.3 ± 3.6ms であった (グラフ 1、2、3)。統計解析上は、いずれも有意差を認めなかった。

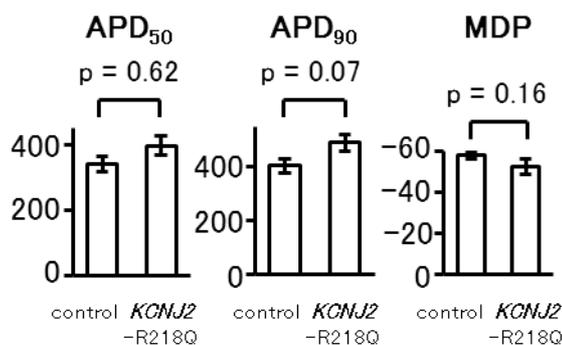
グラフ 1 : コントロールと疾患特異的 iPS 細胞 (*KCNJ2*-R218W) 由来心筋細胞の比較



グラフ 2 : コントロールと疾患特異的 iPS 細胞 (*KCNJ2*-R67W) 由来心筋細胞の比較



グラフ 3 : コントロールと疾患特異的 iPS 細胞 (*KCNJ2*-R218Q) 由来心筋細胞の比較



I_{K1} 電流は活動電位第 3 相、第 4 相や静止膜電位に影響を及ぼすため、疾患特異的 iPS 細胞由来心筋細胞の活動電位持続時間や MDP への影響が予想された。本研究の方法では、iPS 細胞の心筋細胞への分化は成功しているが、心筋細胞としては未成熟である。I_{K1} 電流は、分化度の低い心筋細胞では電流量が少ないため、この方法で確立した細胞では I_{K1} 電流量が少なく、統計解析の結果では有意差を認められなかったと推測される。

(3) 多電極アレイでの比較

多電極アレイを用いてコントロールと疾患特異的 iPS 細胞 (*KCNJ2*-R218W、-R67W、-R218Q) 由来心筋細胞それぞれにおいて検

討した。その結果、自発的な拍動レートは有意差を認めず、また、心電図におけるQT間隔と同等と考えられているフィールドポテンシャル持続時間も有意差を認めなかった。この結果より、QT延長症候群7型患者では健常人と比較して明らかなQT時間延長を認めないことを支持すると推測された。

(4) Ca transient

不整脈のメカニズムに関して研究するため、Ca imaging dyeを用いてカルシウム動態を観察した。自発的な拍動する心筋細胞を測定した結果、疾患特異的iPS細胞(KCNJ2-R218W、-R67W、-R218Q)由来心筋細胞では、コントロールよりも頻繁に不規則なカルシウム放出を認めた。また、1Hzで電気的ペーシングを施行し、観察した結果、intensity、ピークまでの時間などのパラメーターに有意差を認めなかった。

(5) 薬剤の検討

多電極アレイにて薬剤について検討した。イソプロテレノール投与した結果、コントロールの胚葉体では拍動数の増加を認めたが、不整脈イベントを認めなかった。しかし、疾患特異的iPS細胞(KCNJ2-R218W、-R67W、-R218Q)由来心筋細胞では拍動数が増加し、不整脈イベントが誘発された。

次に、QT延長症候群7型患者に治療として注目されているフレカイニドについて検討した。フレカイニド投与前後で比較した結果、疾患特異的iPS細胞(KCNJ2-R218W、-R67W、-R218Q)由来心筋細胞ではectopic activitiesを減少させた。フレカイニドを投与した状態でイソプロテレノールを追加しても不整脈イベントが誘発されなかった。これらのことよりフレカイニドは治療効果だけでなく予防効果もあると考えられた。

また、メカニズム解明のため、カルシウムハンドリングについても観察した。疾患特異的iPS細胞(KCNJ2-R218W、-R67W、-R218Q)由来心筋細胞では、フレカイニド投与前では不規則なカルシウムイオンの放出を観察されたが、フレカイニド投与後は、有意に減少した。

本研究では、KCNJ2遺伝子異常を検出したQT延長症候群7型患者より疾患特異的iPS細胞を樹立し、不整脈メカニズムや薬剤について検討した。上記結果より、疾患特異的iPS細胞由来心筋細胞は、疾患モデルとして細胞レベルで再現できており、病態解明や薬効評価に有用と考えられた。

現在、共同研究者により、これらの結果を総括し、論文投稿中である。

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1件)

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.

[学会発表](計5件)

Yusuke Kuroda. Disease Modeling of Long-QT syndrome Type 7 Using Patient-specific iPS Cells. 第79回日本循環器学会学術集会, 大阪, 4.24-4.26, 2015

黒田 裕介, 湯浅 慎介, 堀江 稔, 堀米 仁志, 神谷 香一郎, 福田 恵一. Reverse-mode Na⁺/Ca²⁺ Exchanger Inhibitor Suppresses an Arrhythmogenic Substrate in Andersen-Tawil Syndrome-induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes. 第62回日本心臓病学会学術集会, 仙台, 9.26-28, 2014.

Hasegawa K, Ohno S, Itoh H, Hattori T, Makiyama T, Toyoda F, Ding WG, Chinushi M, Matsuura H, Horie M. A Novel KCNQ1 missense mutation identified in a patient with juvenile-onset atrial fibrillation causes constitutive open IKs channel. 第77回日本循環器学会総会・学術集会, 横浜, 3.15-17, 2013

Horie M, Ohno S, Itoh H, Hayashi H, Kimura H, Hattori T, Kawamura M, Naiki N, Dochi K, Hasegawa K, Makiyama T. Genetic and acquired background of fatal arrhythmias. 第77回日本循環器学会総会・学術集会, 横浜, 3.15-17, 2013

Sasaki K, Makiyama T, Yoshinori Yoshida Y, Itoh H, Kawamura M, Sumitomo N, Miura M, Harita T, Nishiuchi S, Hayano M, Yamamoto Y, Wuriyanghai Y, Chen J, Kamakura T, Hattori T, Ohno S, Horie M, Yamanaka S, Kimura T. Modeling Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia Using Human Induced Pluripotent Stem Cells: A Promising Tool for Drug Discovery. American Heart Association Scientific Sessions, Dallas, America, 11.16-20, 2013

[その他]

ホームページ等

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqmed1/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

服部 哲久 (HATTORI Tetsuhisa)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：80638932

(2)連携研究者

黒田 裕介 (KURODA Yusuke)
名古屋大学・医学部

湯浅 慎介 (YUASA Shinsuke)
慶應義塾大学・医学部・講師