

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670355

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた致死的不整脈の死後診断の試み

研究課題名(英文) Postmortem diagnosis of arrhythmic death by using iPS cells

## 研究代表者

松本 博志 (Matsumoto, Hiroshi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60263092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：不整脈死等機能性疾患については未だ診断が不可能である。この研究では機能性疾患死の死後診断をiPS細胞を活用することによる可能性を検討した。iPS細胞株での培養環境は困難を極め線維芽細胞が増殖するという課題が生じたが解決への道筋が見えた。また、分化させた心筋細胞についてその調律測定で不整脈を評価することをMED64で測定する系を確立した。死後の皮膚線維芽細胞の採取、iPS細胞化、心筋細胞分化の系を次ぎのphaseで確立する。

研究成果の概要(英文)：Arrhythmia has never been diagnosed after death. Then, we hypothesized that arrhythmia can be postmortem diagnosed iiPS-related cardiomyocyte induced by skin fibroblast. To clarify the hypothesis, the object in this study was to found iPS cell culture and established the system for detection of arrhythmia using carddiomyocytes. It was difficult to culture iPS cells, leading to increase fibroblasts. On there other hand, we could detect arrhythmia in cardipmyocytes using MED64. We are challenging the isolation of skin fibroblast after death and inducing iPS cells, leading to postmortem diagnosis of arrhythmia using iPS cells.

研究分野：法医学

キーワード：突然死 機能性疾患 iPS 死因診断

## 1. 研究開始当初の背景

わが国において突然死は7万人から10万人と推定されている(1)。その中で器質的な心臓性突然死は3割、その他不整脈をはじめとする機能性疾患による突然死は7割とされている。器質的な心臓性突然死には、心筋梗塞、冠症候群、拡張型心筋症、肥大型心筋症等が、血管疾患では大動脈解離や大動脈瘤破裂等、死後の解剖検査によって明らかにできる。ただし、わが国においてはこの解剖検査もほとんどの地域では犯罪死体および変死体に対する刑事訴訟法が中心でなされる。明らかな非犯罪死体に多いと推定される突然死については唯一監察医制度地域でなされているものの、9割近くは解剖されていないため、その正確な実態は不明である。また機能性疾患による死亡については解剖されても死後診断ができない(2)。

一方、山中らは2006年にマウスの皮膚線維芽細胞に対して4つの遺伝子(山中因子)を導入することで幹細胞性を持つことを発見した。その後ヒトにおいても作製できることが示され(3)、現在は、臨床試験まで行われるようになっている。

ヒトの死後において、皮膚は虚血性変化に強く、その細胞はしばらく生きており、死後1日以降であっても解剖時に鷺皮、いわゆる“寒疣(さむいぼ)”が生じることも知られている(4)。

以上により、私たちは、死後、皮膚線維芽細胞を抽出し、iPS細胞を作製することで、心筋細胞に分化させることができ、死亡時の状況の再現で不整脈等が生じ死亡したことを証明できると考えた。

## 2. 研究の目的

目標を不整脈等機能性疾患による死亡を死後診断するために、皮膚線維芽細胞からiPS細胞を生製し、そこから心筋細胞に分化させ死亡時の環境下における不整脈の発生を証明することとし、そのためにiPS細胞培養の基盤整備と培養手技の確立。生製したiPS細胞から心筋細胞への分化、さらに心筋細胞の調律の測定法の確立等を目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) iPS細胞培養と心筋細胞への分化

医薬品基板研究所の細胞バンクよりヒトiPS細胞株を購入し、その培養と凍結保存環境を検討した。既報(5)に従って、凍結細胞株を解凍した後、培養を行った。培養後は24時間ごとに培地を交換するとともに、経時的に顕微鏡下で観察し、コンフルエントになった段階で分散し、再び凍結をすることを繰り返し、安定した培養環境の構築を目指した。

この培養株に対して、既報(6)に従って心筋細胞への分化を検討した。心筋細胞に分化したか否かは顕微鏡下の観察において細胞に調律運動が生じているか否かで判断をした。

### 2) 心筋細胞の調律評価

心筋細胞が不整脈を来しているか否かはその調律運動で評価する必要があるため、私たちは既存機器であるMED64(アルファメッドサイエンティフィック社)を用いてその調律運動を測定した。その評価に使用したのはラット心筋細胞である。妊娠ラットより麻酔下にて胎児を取り出し、心臓を摘出、その後、心筋細胞を精製し、初代培養を行った。24時間後にMED64の電極を装着させ、その調律運

動を測定し、解析アプリケーション Mobius で定量化した。

#### 4 . 研究成果

##### 1 ) iPS 細胞培養と心筋細胞への分化

iPS 細胞の培養環境の構築に時間がかかったが、培養できるようになった。ところが培養中に線維芽細胞が増殖することを見だし FGF の添加をしない培養環境が必要であった。心筋細胞への分化についても線維芽細胞が増殖することが多いことが明らかになった。この点の改善については、既報 ( 7 ) にある線維芽細胞から直接、心筋細胞を分化させる方法の検討を考慮する必要があり、実験検討中である。この手法をとると iPS 細胞化する必要がないため、ステップや時間、コストをかなり減らすことができるものと推定している。

##### 2 ) 心筋細胞の調律評価

MED64 を使って調律運動を評価できる環境を確立した。この MED64 とは 64 極の電極を円形のガラス上に埋め込まれており、この上で培養し何らかの負荷が生じた際の調律の変化を捉えることができるものである。そこで、当教室で確立されている心筋細胞の熱中症モデルにおいて適用したところ、適切な評価が得られた (Hirata et al., in preparation) 上記の iPS 細胞から分化させた心筋細胞への適用が期待される。

この挑戦的萌芽研究にふさわしい研究テーマであったが、困難を極め、期間延長をして挑戦した。結果としてはこの研究テーマの将来への足がかりが出来たと考えてよい。

#### < 引用文献 >

1) 2009 年合同班。心臓製突然死の予知

と予防法のガイドライン (2010 年改訂版)。日本循環器学会、2010 .

- 2) 松本 博志【法医と病理の相互理解】病理医へのメッセージ 行政解剖とその魅力 . 病理と臨床 (0287-3745)32 巻 7 号 Page754-757
- 3) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Cell 126, 663-676, 2006.
- 4) 錫谷徹 . 法医診断学 . 南江堂、1985 .
- 5) Takahashi et al. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. Nature Protocol 2:3981-9, 2007.
- 6) Moretti et al. Patient-Specific Induced Pluripotent Stem-Cell Models for Long-QT Syndrome. N Engl J Med 363:1397-1409, 2013.
- 7) Efe et al. Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy . Nat Cell Biol 13: 215-222, 2011.

#### 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 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 2 件 )

Hiroshi Matsumoto, Chipin Yang and Kana Sugimoto. Role of TLR7 in development of alcoholic fatty liver disease: a new target

for prevention of alcoholic fatty liver disease. April 2016 The FASEB Journal vol. 30 no. 1 Supplement 516.8.

Yuichiro Hirata, Kana Sugimoto, Yu Kamakura, Genki Yoshida, Ryuichi Katada, Hiroshi Matsumoto. Effect of heat stress on the conduction system in neonatal rat cardiomyocytes. Jpn J Legal Med 70(1): 121.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.legal.med.osaka-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本博志 (Matsumoto, Hiroshi)

大阪大学大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60263092

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

杉本 香奈

Yang Chi-pin

平田 雄一郎

鎌倉 悠