

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012

課題番号：24659387

研究課題名（和文） 致死性不整脈疾患におけるヒト iPS 細胞を用いた新規原因遺伝子探索

研究課題名（英文） New approach to analyze inherited arrhythmias using human iPS cells

研究代表者

木村 剛 (KIMURA TAKESHI)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：80359786

研究成果の概要（和文）：

本研究では、ヒト iPS 細胞を用いた遺伝性不整脈疾患の病態解明を目指した研究を行った。ヒト iPS 細胞由来分化心筋細胞に関する長期培養による成熟化の検討では、1 年に及ぶ長期培養の解析にて、成熟化を認めるも緩徐で不完全であり、より効率的な成熟化法の開発が必要であると考えられた。疾患特異的 iPS 細胞研究として、リアノジン受容体遺伝子異常が同定されているカテコラミン誘発性多形性心室頻拍（CPVT）患者より、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、カテコラミン負荷後に拡張期細胞内 Ca 増加を生じる細胞が有意に多く、CPVT の病態を細胞レベルで一部再現できた。また、新規疾患原因遺伝子の探索として、候補遺伝子解析にて原因遺伝子不明の家族性不整脈症候群の家系（有症候 9 例）において、3 例より iPS 細胞を作成し、分化心筋の生理学的解析、deep sequencing を行い解析中である。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we investigated the disease causing mechanisms of inherited arrhythmias using human iPS cell derived cardiomyocytes; 1. We assessed the ultrastructural changes of hiPS-CMs during a one-year culture and demonstrated the ultrastructural sarcomeric maturation process. 2. We generated disease-specific iPS cells from a patient associated with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. The differentiated cardiomyocytes had an increased susceptibility to catecholamine-induced calcium waves indicating that the cells recapitulated the CPVT phenotype. 3. We generated iPS cells and conducted whole exome sequencing in a large family with an inherited arrhythmia (under analysis).

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	2,900,000	870,000	3,770,000

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

心臓突然死を引き起こす遺伝性不整脈疾患として、心電図上の著しい QT 間隔延長と多形性心室頻拍による失神・突然死を特徴とする遺伝性 QT 延長症候群、中年男性が夜間

突然死する Brugada 症候群、他にカテコラミン感受性多形性心室頻拍、不整脈源性右室心筋症、QT 短縮症候群、早期再分極症候群等があり、これらの疾患はそれまで健康であった青壮年が突然死するため、社会的影響が

非常に大きい。治療は対処療法（致死性不整脈に対する植込み型除細動器(ICD)治療)のみで根本的治療法は確立されていない。分子遺伝学の進歩により、種々の心臓イオンチャネル遺伝子等の変異がこれら遺伝性不整脈疾患の原因として発見されてきた。しかし、最も研究が進んでいる QT 延長症候群でも 50%、Brugada 症候群では、15%程度の患者でしか遺伝子異常が同定できず、発症機序に関して未だ不明な点が多い。

今まで、患者自身の心筋細胞を用いた研究はほぼ不可能であったが、2007 年、山中ら（現、京都大学 iPS 細胞研究所）が開発したヒト iPS 細胞を用いることにより、患者の皮膚や血液から、患者自身と同じ遺伝的背景を持つ心筋細胞を作製し、解析することが可能となった。体細胞から ES 細胞とほぼ同等の多分化能をもつ幹細胞を作り出すことができる画期的な手法であり、「再生医療への応用」、「疾患発症機序の解明」、「創薬への応用」に新たな可能性を広げ、現在、医学領域において大変注目されている。循環器分野においても盛んに iPS 細胞を用いた研究（心筋再生・移植研究、遺伝性心疾患の発症メカニズム解明）が行われている。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト iPS 細胞を用い、(1) ヒト iPS 分化心筋自体の解析、(2) 遺伝性不整脈疾患由来 iPS 細胞の解析、(3) 原因不明の遺伝性不整脈患者における新規原因遺伝子の同定・病態解明、を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 健康人皮膚より樹立した線維芽細胞に、山中 4 因子 (OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC 遺伝子) をレトロウイルスにて導入し作製された iPS 細胞株 (201B7) を用いた。胚様体形成法 (Yang et al. Nature 2008) を用いて心筋分化し、14、30、60、90、180、360 日の分化心筋の解析を行った。(接着培養) 電子顕微鏡、免疫染色を用いた組織学的解析、定量的 RNA 解析を用いた遺伝子発現解析を行った。

(2) カテコラミン誘発性多形性心室頻拍 (CPVT) 患者より iPS 細胞を作製。心筋分化後、Fluo-8 を用い、単一心筋細胞の Ca transient を計測した

(3) 通常の遺伝子解析にて遺伝子異常を認めない遺伝性不整脈疾患家系 (affected 9 名)、において deep sequencing を行い、iPS 細胞作製を行った。

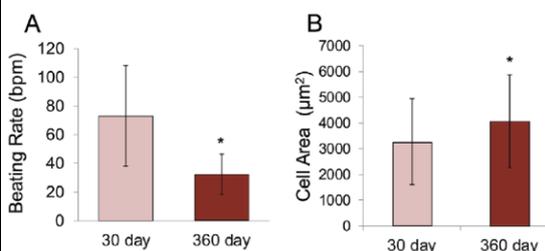
4. 研究成果

本研究では、ヒト iPS 細胞を用いた遺伝性不整脈疾患の病態解明を目指した研究を行った。

(1) ヒト iPS 細胞由来分化心筋細胞に関する長期培養による成熟化の検討

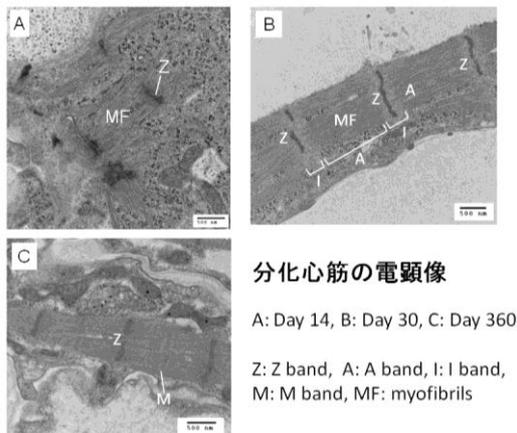
ヒト iPS 細胞は、心筋分化開始後、day 8 より自己拍動を開始し、day 360 まで胚様体は自己拍動を続けたが、拍動数の減少を認めた。(day 30, 73.2 ± 34.9 bpm, $n=41$ vs. day 360, 32.2 ± 14.2 bpm, $n=42$, $p < 0.0001$) 酵素処理にてばらした単一心筋細胞の細胞面積は増加していた。(day 30, $3277.4 \pm 1679.5 \mu\text{m}^2$ vs. day 360, $4067.9 \pm 1814.6 \mu\text{m}^2$, $p=0.01$) (図 1)

図 1 ヒト iPS 細胞由来分化心筋細胞長期培養における、拍動数、表面積の変化



自己拍動のある胚様体における心筋細胞の割合を検討するため、microdissection 後、酵素処理を行い、免疫染色を行った。心筋トロポニン I 陽性の心筋細胞を、day 30, 61% ($n=213$), day 360, 64% ($n=191$) 認め、他に、 β III-tubulin 陽性の線維芽細胞、 α -SMA 陽性の神経細胞を認めた。また、day 360 では、MLC2v 陽性、MLC2a 陰性細胞が 36% から 60% に増加し、心室筋への成熟化傾向を示した。電子顕微鏡を用いた組織学的解析では、day 14 では、サルコメアが粗であるが、day 30 以降密になり、A、I 帯の出現を認めた。day 60 から day 90 にて、H 帯が出現し、day 360 にてようやく一部の心筋にて M 帯を認めた。(図 2)

図2 分化心筋の電顕像



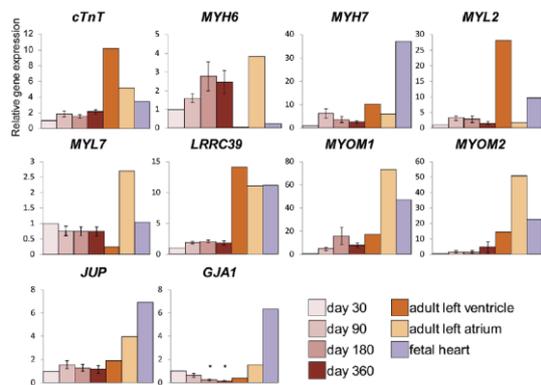
分化心筋の電顕像

A: Day 14, B: Day 30, C: Day 360

Z: Z band, A: A band, I: I band, M: M band, MF: myofibrils

遺伝子発現の解析では、M帯関連蛋白(LRRC39, MYOM1, MYOM2)は、成人心筋に比べて低下し、経時的増加も少なく、電子顕微鏡によるサルコメアの成熟化の遅延に合致する結果であった。(図3)

図3 ヒト iPS 細胞由来分化心筋の長期培養における遺伝子発現



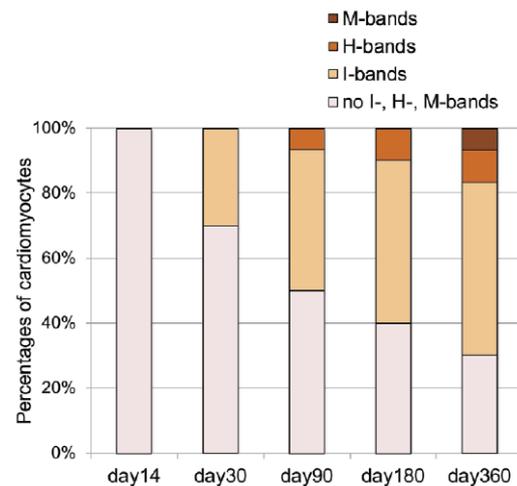
本研究は、ヒト iPS 細胞由来分化心筋の長期接着培養における成熟過程を明らかにした。day 30 と day 360 の比較にて、細胞面積の増加や拍動数の低下を認め成熟化の進行と考えられた。遺伝子発現でも、MLC2v 陽性、MLC2a 陰性細胞数が増加し、成熟化傾向を示した。day 360 にてようやく M 帯のある心筋細胞を認めたが、割合は数%と少なく(図4)、緩徐な成熟過程であると考えられた。要因としては、

ヒト成人心にある液性因子、機械的ストレスなどの欠除が要因と推察された。

幹細胞由来分化心筋の未熟さは以前より指摘されているが、本研究では、長期培養にて初めて M 帯を形成した iPS 細胞由来分化心筋を認めた。但し、成熟化は緩徐で不完全であり、より効率的な成熟化法の開発が必要であると考えられた。

図4 ヒト iPS 細胞由来分化心筋におけるサルコメアの成熟過程

(電子顕微鏡による観察)



(2) 疾患特異的ヒト iPS 細胞を用いた疾患発症メカニズムの解明

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、リアノジン受容体遺伝子異常が同定されているCPVT患者より、iPS細胞を作製し分化心筋の解析を行った。電氣的ペースング下にCa transient測定を行ったところ、CPVT患者由来分化心筋では、カテコラミン負荷後に拡張期細胞内Ca増加を生じる細胞が有意に多く、CPVTの病態を細胞レベルで一部再現できた。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。

(3) 新規疾患原因遺伝子の探索

候補遺伝子解析にて原因遺伝子不明の家族性不整脈症候群の家系(有症候6例)において、3例よりiPS細胞を作成し、分化心筋の電気生理学的解析、whole exome sequencingを行い解析中である。

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 6 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, Ono 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.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 牧山武: Phenotypic characteristics between SCN5A and LMNA mutation carriers in familial bradyarrhythmic disorders. The 5th Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHRS) 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 (APHRS) 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 (APHRS) 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.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 剛 (KIMURA TAKESHI)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：80359786

(2) 研究協力者

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