

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月14日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10080

研究課題名(和文) 遺伝性心筋症のiPS細胞由来心筋細胞の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of iPS cell-derived cardiomyocytes with hereditary cardiomyopathy

研究代表者

勝部 康弘 (YASUHIRO, KATSUBE)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20246523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は遺伝性心筋症患者からiPS由来心筋細胞の作成し、作成したiPS細胞由来心筋細胞の電気生理学的特性を検討することである。健常者ならびに拡張型心筋症(DCM)患者(1歳の女兒)よりiPS由来心筋細胞の作成を行うことができた。作成した心筋細胞を用いてMED64システムで電気生理学検討を行うことができた。DCM患者のQT時間は健常者より延長しており、刺激薬、イソプロテレンールで短縮することが確認できた。今後他の電気生理学手法を用いた評価を追加する。さらに他の遺伝性心筋症も同様に検討し研究の幅を広げたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

患者自身の心筋細胞を用いた遺伝性心筋症についての研究、特に細胞レベルから見た機能解析の研究はこれまで全く行われていない。近年これまでヒトを用いた研究が難しかった領域でiPS細胞を用いた研究が盛んにおこなわれるようになり、新しい知見が次々と報告されるに至っている。不整脈領域ではQT延長症候群への応用がかなり進んでいるが、遺伝性心筋症の患者iPS細胞を用いた研究はほとんど行われていない。本研究により、遺伝性心筋症患者への心筋細胞レベルでの薬剤評価などが進むものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to create iPS-derived cardiomyocytes from patients with hereditary cardiomyopathy and to investigate the electrophysiological characteristics of the generated iPS cell-derived cardiomyocytes. We were able to prepare iPS-derived cardiomyocytes from healthy subjects and patients with dilated cardiomyopathy (DCM) (1-year-old girl). The electrophysiology study could be carried out in prepared cardiomyocytes using the MED64 systems. It was confirmed that the QT time of DCM patients was prolonged than that of healthy individuals, and it was shortened by stimulant, isoproterenol. Future evaluations using other electrophysiology methods will be added. We would like to consider other hereditary cardiomyopathies as well and broaden our research.

研究分野：小児循環器

キーワード：iPS細胞 遺伝性心筋症 心筋細胞 パッチクランプ法 電気整理

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

患者自身の心筋細胞を用いた遺伝性心筋症についての研究、特に細胞レベルから見た機能解析の研究はほとんど行われていない。近年ヒトを用いた研究が難しかった領域で iPS 細胞を用いた研究が盛んにおこなわれるようになり、新しい知見が次々と報告されるに至っている。不整脈領域では QT 延長症候群への iPS 細胞の応用がかなり進んでいる。一方、遺伝性心筋症の患者 iPS 細胞を用いた研究はほとんど行われていないのが現実である。

2. 研究の目的

本研究では遺伝性心筋症について患者さんからの試料を用いて iPS 細胞を作製し、さらにヒト心筋細胞へと分化させたのち、その機能解析を電気生理学的手法により行い、健常者とは異なる心筋症に特徴的な特徴を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 拡張型心筋症患者検体

1歳女児、DCM、トロポニン I3 遺伝子(TNNI3)のエクソン 5 に c.235C>T (p.Arg79Cys)の変異がシークエンスにより確かめられている。他に bMHC, TNNI3, MyBPC, TNNT2, TPM1 遺伝子を検索したが、これらには疾患原因となるような変異は認められていない。なお、本変異の PolyPhen-2 スコアは 0.936、SIFT スコアは 0.01 であり、有害な変異と推定される。なお、先天性心疾患患者における iPS 細胞作製の研究に関しては、東京女子医科大学における倫理委員会から承認を得て実施した。動物実験に関しても、東京女子医科大学実験動物委員会の承認を得て実施した。

2) 血液から不死化 B 細胞を調製

ヘパリン採血により抗凝固処理した末梢血約 7.5mL を遠心管に入れ 2500rpm、5min 遠心後、上清の血漿(約 2.5ml)を除いた。残った赤血球、リンパ球などを含む血液に低張液を 5 倍量(20ml)加え、穏やかに 2min、転倒混和し赤血球を破裂させた。1000rpm、5min 遠心後、上清を除き、10ml PBS で一回 wash した。1000rpm、5min 遠心後、リンパ球を含むペレットに B 細胞用培地と Epstein-Barr virus 懸濁液、各 2.5ml を加え、懸濁し、プレートに播種した。CO₂ インキュベーター(5% CO₂)により、B 細胞用培地を用いて 80 日間浮遊培養した。増殖性の細胞が得られたら、セルバンカー(Takara)を用いて凍結保存(-135 並びに液体窒素下)した。

3) 不死化 B 細胞から iPS 細胞を誘導

ヒト末梢血由来の凍結保存 B 細胞株を急速解凍し、10% FBS を含む GIT 培地を用いて 37 CO₂ インキュベーター内で 1~2 週間培養し、増殖の盛んな状態とした。接着培養用 6 well plate の well を、ラミニン 511 を含む PBS で 37 1 時間以上コートした。その後、ラミニンコートした 6 well plate からラミニン/PBS を除き、コンプリート StemFit AK02N 培地を 2 mL/well で添加した。増殖した不死化 B 細胞を PBS (-)で洗浄後、1x TrypLE で剥離し、さらに Opti-MEM にて 2-3 回洗浄して、Opti-MEM に再懸濁した(1x10⁶ cells/0.1 mL/キュベット)。6 種類の遺伝子、ヒト OCT3/4、SOX2、KLF-4、c-MYC、LIN28、マウス p53DD (c-terminal dominant negative)を含むエピソーマルプラスミド 10 µg を電気穿孔法により不死化 B 細胞に導入した。その細胞懸濁液(100 µL)を直ちに各々 2 wells に蒔き、37 CO₂ インキュベーターで培養した。2-3 週間で複数の iPS 細胞様のコロニーが出現した。これらのコロニーを 0.5x TrypLE 少量を用いて剥離し、単細胞化し、ラミニンコートした培養用 well に移し、10 µM Y-27632 を加えたコンプリート StemFit AK02N により培養を継続した。翌日、Y-27632 を含まないコンプリート StemFit AK02N 培地に交換した。基本的に毎日培地を交換した。継代の際、残り細胞は StemCell Banker で懸濁し、-80 で凍結保存した。

4) iPS 細胞の多分化能の検定と核型の確認

多分化能マーカーの発現: 樹立した iPS 細胞様のコロニーについて、多分化能マーカー(TRA-1-60, SSEA4, NANOG, OCT4)の発現を免疫蛍光染色により検討した。iPS 細胞様コロニーを PBS で洗浄後、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液(Wako)により固定し、0.2% Triton-X 100/PBS により透過処理、3% BSA/TBST を用いてブロッキングを行った。一次抗体として、抗 TRA-1-60 マウス IgM モノクローナル抗体(GTX48033, GeneTex), 抗 SSEA4 マウス IgG モノクローナル抗体(ab16287, Abcam), 抗 NANOG ウサギ抗体(ab21624, Abcam), 抗 OCT4 ウサギ抗体(ab19857, Abcam),を用い、二次抗体として、Alexa Fluor 488 抗マウス IgM 抗体(A21042, Invitrogen) Alexa Fluor 488 抗マウス IgG 抗体(A21202, Invitrogen) Alexa Fluor 488 抗ウサギ IgG 抗体(A21206, Invitrogen)を用い、糸状(filamentous)アクチン染色のために Rhodamine Phalloidin (Cytoskeleton)、核染色のために 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)を用いた。

テラトーマ形成能: 免疫不全マウス(SCID マウス, CB-17/Icr-scid/scid)の精巣に iPS 細胞を移植してテラトーマを形成させ、三胚葉への分化能を確認した。麻酔を施した免疫不全マウス(SCID マウス, CB-17/Icr-scid/scid)の精巣の一つに、およそ 1x10⁶のヒト iPS 細胞を注入した。およそ 80 日後、マウスを麻酔下安楽死させ、精巣を切除しテラトーマ塊を摘出した。4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液(Wako)を用いて固定し、パラフィン包埋試料の切片(5 µm)を脱パラフィン後 HE 染色し、三胚葉への分化を顕微鏡下観察した。

株式会社日本遺伝子研究所に委託して、核型の検定を実施し、染色体に異常が生じていないかを確認した。

5) iPS 細胞から心筋細胞を分化誘導

Day 0: ヒト iPS 細胞を 0.5 mM EDTA を含む PBS (-)を用いて iPS コロニーを剥離・単細胞化し、10 μg/mL Y-27632、を含む StemPro34 コンプリート培地を用いて非接着型マルチウェルプレート (Ultra-low attachment multiple well plate, 6 well, Corning) 又は培養用ディッシュ (PrimerSurface シャーレ 90 mmMS-9090X, 住友ベークライト) に播種した。CO₂ インキュベーター (5% CO₂) により 37 °C で培養した。

Day 1: 中胚葉分化誘導のため、最終濃度 2.5 ng/mL BMP4、1.25 ng/mL Activin A、5 ng/mL bFGF となるように、Y-27632 を含まない StemPro34 コンプリート培地を追加した。

Day 4: 心筋細胞誘導のため、10 μM KY02111、10 μM XAV939、10 ng/mL hVEGF を含む StemPro34 コンプリート培地に交換した。

Day 8~10 で自発的に拍動する心筋塊を得た。

Day 10: 維持用培地 5 ng/mL BMP4、5 ng/mL bFGF、10 ng/mL hVEGF を含む StemPro34 コンプリート培地に半交換した。(以降、3-4 日目ごとに培地を半交換した。)

Day 15~21 で拍動中の凝集細胞塊を Trypsin で再懸濁し、培養用 dish に 10% FBS DMEM-Ham's F12 培地を用いて再播種した。この後、MACS (PSC-derived cardiomyocyte Isolation kit, ミルテニー) を用いた心筋細胞の濃縮を行った。

6) ヒト iPS 細胞誘導心筋細胞の MED64 システムによる機能解析

MED64 システム (アルファメッドサイエンティフィック株式会社) は、微小電極アレイ (Micro-Electrode Array, MED プローブ)を用いた細胞外電位 (Field potential: FP) 計測システムである。MED プローブを 10 cm dish に入れ、dish 内の湿度を保つため 5 mL 以上の精製水をプローブの周囲に撒いた。ビトロネクチン液 2.5 μL 用いて、MED プローブの平面微小電極部分を 37 °C 2 時間程度コートした。Trypsin を用いて分化心筋細胞を単細胞化し、心筋細胞用培地 (10% FBS DMEM-Ham's F12) に懸濁した。プローブの平面微小電極部分からコート液を除き、直ちに分化心筋細胞 3x10⁴ cells/3 μL を播種した。37 °C CO₂ インキュベーター内で 2 時間程度静置し、細胞が接着したところで、2 mL の心筋細胞用培地を穏やかに添加し培養を継続した。さらに細胞がよく接着し安定した拍動が始まるまで数日間、37 °C CO₂ インキュベーター内で培養した。本システムにより、MED プローブの平面微小電極部分に接着拍動している分化心筋細胞の FP 波形を記録し、拍動間隔や QT 間隔に相当する FP 持続時間 (FP duration: FPD) を求め、FPdCf (FP 持続時間を Fridericia 補正式、 $QTcF = QT/3 \sqrt{RR}$ により補正したもの)を算出した。

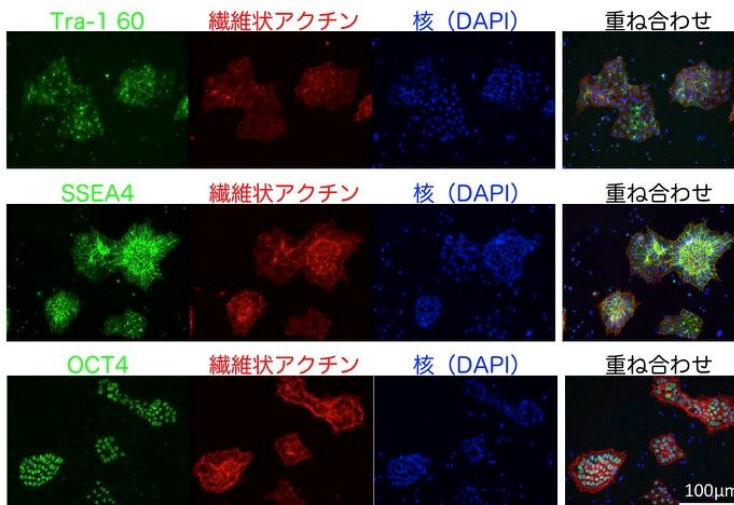


図 1 幹細胞マーカー (Tra-1-60, SSEA4, OCT4) による樹立した iPS 細胞の免疫蛍光染色

4. 研究成果

1) 不死化 B 細胞から iPS 細胞を樹立

山中因子を含む 6 種類の遺伝子を電気穿孔法により不死化 B 細胞に導入後約 3 週間で、iPS 細胞の形状を示す細胞群が観察された。これらの細胞は、胚性幹細胞のマーカーとされる Oct4, TRA-1-60, SSEA4 陽性を示した(図 1)。免疫不全マウスの精巣に iPS 細胞を移植したところ、およそ 3 ヶ月でテラトーマが形成され、三胚葉へ分化することを確認した(図 2)。DCM 患者 iPS 細胞の核型の検定を実施したところ、核型は正常であった(図 3)。これらの結果から、DCM 患者の不死化 B 細胞から iPS 細胞が樹立できたと考えられる。

2) iPS 細胞から心筋細胞を分化誘導

ヒト iPS 細胞を単細胞とし、一夜浮遊培養すると大小様々な大きさの細胞凝集塊を形成した。

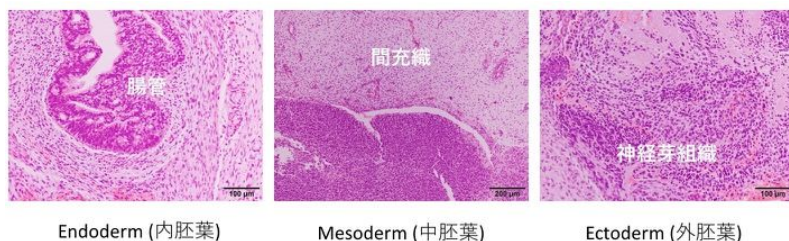


図 2 iPS 細胞から形成されたテラトーマ 三胚葉への分化能を示す。

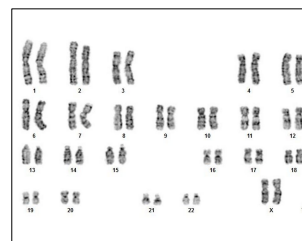


図 3 核型は正常であった。

その後、中胚葉分化誘導を経て、心筋細胞へと分化を進めると、分化開始後 8 日頃に細胞凝集塊の一部に収縮運動が始まった。分化開始後 2 週間から 3 週間で拍動する細胞凝集塊をトリプシン消化により単細胞とし、接着培養に移行した。1 週間後、Stem cell derived cardiomyocyte enrichment kit を用いた MACS 分離により心筋細胞を選別し再び接着培養を行うと、長期間安定して拍動する細胞集団が得られた。分化開始後 1 ヶ月においてもこれらの細胞は拍動を継続しており、心筋細胞マーカーであるトロポニン T の発現が観察された。心筋細胞分化後期マーカーである α -アクチニンも発現しており、強拡大すると、横紋筋構造が観察された。これらの証拠から、ヒト不死化 B 細胞由来の iPS 細胞から心筋細胞が分化誘導されたと考えられる（以下、iPSC-心筋細胞と略称）。

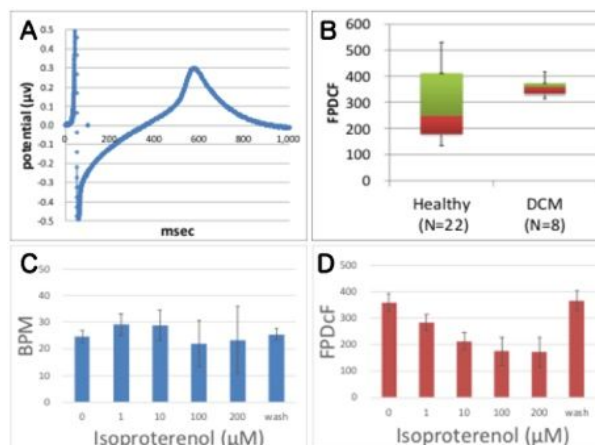


図 4 DCM 患者 iPSC-心筋細胞の細胞外電位を測定

3) MED64 システムによる iPSC-心筋細胞の機能解析

MED プローブの微小電極上に播種した iPSC-心筋細胞は、数時間で接着し、次第に自発収縮運動が同期し、拍動が安定に継続するようになった。MED64 システムにより記録された DCM 患者 iPSC-心筋細胞の FP (Field potential) 波形 (QT 間隔に相当) を図 4A に示した。図 4B に示したように、DCM 患者の FPDcF 値 (平均 358.9 ± 34.8) は、健常者の FPDcF 値 (平均 291.6 ± 134.2) に比べて長い傾向がみられたが、2 標本 t 検定では有意差は検出されなかった (t 値 0.1763, $p > 0.05$)。DCM 患者 iPSC-心筋細胞に 受容体作動薬であるイソプロテレノールを添加したところ、BPM 値はわずかに増減したが (図 4C)、FPDcF 値は濃度依存的に減少し、薬剤を洗浄すると定常状態における値に戻った (図 4D)。本結果から、イソプロテレノールがこの DCM 患者の QT 幅を縮小する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

- 1) 勝部康弘, 羽山恵美子, 古谷喜幸, 中西敏雄, 朴仁三, 小川俊一: ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の電気生理学解析. 第 52 回日本小児循環器学会, 2016.
- 2) 羽山恵美子, 古谷喜幸, 島田光世, 大路栄子, 松岡瑠美子, 中西敏雄, 朴仁三: フィーダーフリー条件下で培養した疾患 iPS 細胞を用いた心筋細胞分化の検討. 第 52 回日本小児循環器学会, 2016.
- 3) 羽山恵美子, 古谷喜幸, 島田光世, 川口奈奈子, 大路栄子, 松岡瑠美子, 稲井慶, 西敏雄, 朴仁三: iPS 細胞を用いた心筋細胞分化における新生児型 Na チャネルの発現. 第 53 回日本小児循環器学会, 2017.
- 4) 勝部康弘, 羽山恵美子, 古谷喜幸, 大路栄子, 中西敏雄, 朴仁三, 赤尾見春, 橋本佳亮, 築野香苗, 上砂光裕, 深澤隆治: 第 53 回日本小児循環器学会, 2017.
- 5) 張ていてい, 川口奈奈子, 羽山恵美子, 古谷喜幸, 中西敏雄: モノクロタリンと低酸素環境によるラット肺高血圧モデルにおいて CXCR4 と MSC マーカーに高発現が観察された. 第 54 回日本小児循環器学会, 2018.
- 6) 羽山恵美子, 古谷喜幸, 川口奈奈子, 勝部康弘, 島田光世, 大路栄子, 松岡瑠美子, 稲井慶, 中西敏雄: 尿中細胞から iPS 細胞を調製. 第 54 回日本小児循環器学会, 2018.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：赤尾見春
ローマ字氏名：AKAO,miharu
所属研究機関名：日本医科大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号(8桁)：60350112

(2)研究分担者

研究分担者氏名：星野レイ
ローマ字氏名：HOSHINO,rei
所属研究機関名：日本医科大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号(8桁)：20637821

(3)研究分担者

研究分担者氏名：上田美希
ローマ字氏名：UEDA,miki
所属研究機関名：日本医科大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号(8桁)：20741010

(1)連携研究者

研究分担者氏名：小川俊一
ローマ字氏名：OGAWA,shunichi
所属研究機関名：日本医科大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号(8桁)：50194436

(2)連携研究者

研究分担者氏名：中西敏雄
ローマ字氏名：NAKANISHI,toshio
所属研究機関名：東京女子医科大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号(8桁)：90120013

(3)連携研究者

研究分担者氏名：羽山恵美子
ローマ字氏名：HAYAMA,emiko
所属研究機関名：東京女子医科大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号(8桁)：00349698

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。