

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790726

研究課題名（和文） 患者 iPS 細胞を用いた肥大型心筋症の病態解析

研究課題名（英文） Disease analysis of Hypertrophic cardiomyopathy using patient specific induced pluripotent stem cells

研究代表者

江頭 徹 (EGASHIRA TORU)

慶應義塾大学・医学部・研究員(非常勤)

研究者番号：10465023

研究成果の概要（和文）:

肥大型心筋症患者および健康人から iPS 細胞を樹立し、in vitro で安定的に心筋細胞へ分化誘導させることに成功した。誘導心筋の多面的な解析を行い、ベースラインでは有意差を見いだせなかったが、心肥大促進因子を負荷したところ、肥大型心筋症患者 iPS 細胞由来心筋細胞では心筋細胞の肥大および構造蛋白の錯綜配列が出現し、同因子への細胞応答の差が肥大型心筋症の発症に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）:

We generated iPS cells from patients with hypertrophic cardiomyopathy (HCM) and unaffected healthy volunteers. We also succeeded to differentiate generated iPS cells into cardiomyocytes in vitro reproducibly. Although we examined the various aspects of functional characteristics of iPS cells-derived cardiomyocytes and did not find those of significant differences in both cells, we clarified that the administration of X factor known as promoting cardiac hypertrophy highly induced cellular hypertrophy and disarray of alignment in structural proteins in HCM patient iPS cells-derived cardiomyocytes. Such phenomenon indicated that the difference of cellular response against X factor can contribute to onset of HCM.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：循環器 遺伝性疾患 モデル化 iPS 細胞 トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

(1) これまでは生きたヒト病的な心筋細胞を直接解析する術が無く、心臓病研究を遅滞させ

ている主因であった。ヒト iPS 細胞技術を用いれば、心臓病患者由来 iPS 細胞から生きた病的な心筋細胞を作製することができ、新しい病態解析モデルの構築が期待される。

(2)実際に神経疾患や血液疾患で樹立したiPS細胞から分化誘導された細胞が由来する患者の病態を正確に再現し、invitroの実験系において薬剤負荷や遺伝子操作で病態を改善したことが報告されており、肥大型心筋症を始めとした循環器疾患においても同様の結果が期待でき、病態解明、新規治療法に直結する研究になると考えられた。

(3)肥大型心筋症の病態は、サルコメア変異による筋収縮のカルシウム感受性の亢進、Z帯構成要素間の結合親和性の亢進が知られており、現在のところ心筋stiffnessの亢進がベースにあると考えられているが、病因変異がいかなる分子機序で心肥大病態を呈するのかについては依然として不明な点が多い。

2. 研究の目的

肥大型心筋症患者iPS細胞を樹立し、分化誘導した生きた病的心筋の解析により、これまでに報告されていない細胞分子レベルでの異常を明らかにし、本疾患の病態解明及び新規治療法の開発に繋がる研究を行う。

3. 研究の方法

(1)
3名の肥大型心筋症患者および3名の器質的心疾患を有さない健常者からiPS細胞を樹立した。

(2)
樹立したiPS細胞の品質評価を行い、良質な細胞株を各々3株ずつ選定した。

(3)
樹立したiPS細胞を浮遊培養法により心筋細胞へ分化誘導した。

(4)
各々の誘導心筋細胞の性質を比較した。

(5)
各々の誘導心筋細胞に心肥大の誘因となる薬剤を負荷し、反応性を比較した。

4. 研究成果

(1)山中法を用いたiPS細胞の樹立

3名の肥大型心筋症患者および3名の器質的心疾患を有さない健常者の皮膚繊維芽細胞にレトロウィルスベクターを用いてリプログラミング因子(*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *CMYC*)を導入し、iPS細胞を樹立した。各検体から30株

程度iPS細胞を樹立し、凍結保存した。

(2)樹立したiPS細胞の品質評価

樹立したiPS細胞の未分化マーカーの免疫染色、RT-PCR、奇形腫形成、核型解析等を行い、十分な幹細胞性質を獲得している細胞株を同定し、健常人由来iPS細胞3ライン、肥大型心筋症由来iPS細胞3ラインを選別し、それぞれ大量培養系に移行した。

(3)樹立したiPS細胞の心筋分化誘導

分化誘導条件の培地下での浮遊培養により、樹立したiPS細胞から胚葉体形成を行い、2週間程度培養を続け、invitroでの心筋分化誘導に成功した。健常人および肥大型心筋症由来iPS細胞間で心筋分化誘導効率に有意差はなかった。120日程度連続して培養し、分化誘導後30日、60日、90日、120日での心筋細胞を解析対象とした。

(4)誘導心筋細胞の性質の比較検討

誘導された心筋細胞の基本的な性質を電子顕微鏡撮像や免疫染色、RT-PCR法で確認したが、両群間で特記すべき有意差は認められず、心筋細胞への分化誘導が確認された。

網羅的な遺伝子発現パターンの差異を検索するため、2群間の拍動胚葉体から本研究室が開発したミトコンドリア法を用いて心筋細胞のみを精製し、マイクロアレイ法で解析中である。

また多電極細胞外電位測定法にてCaチャンネル遮断薬などに対する電気生理学的反応についても検討したが、自立拍動頻度の低下や再分極時間の短縮などの変化が認められ、両群間で差は無かった。

(5)誘導心筋細胞の薬剤負荷試験

今回樹立を行った肥大型心筋症患者はいずれも発症が青年~壮年期であり、何らかの刺激が蓄積された結果、疾患の表現型を呈しているものと予想されたため、iPS細胞由来心筋細胞に心肥大誘導を起こすことが報告されている薬剤を投与したところ、電子顕微鏡像において、肥大型心筋症患者iPS細胞由来心筋にのみ、肥大型心筋症に特徴的とされる心筋構造蛋白の錯綜配列様の所見を呈することを発見した。現在同薬剤負荷後に心筋細胞の免疫染色を施行したところ、肥大型心筋症患者iPS細胞由来心筋において有意に細胞面積の拡大が認められ、心筋構造蛋白の錯綜配列を呈した。複数ラインで同様の検討を行い、再現性をもって同表現型がみられることが確認された。

同薬剤刺激下に同薬剤の阻害剤を用いたところ表現型の減衰が確認され、同シグナルが発症に関与している可能性が示唆された。

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)

著者名 Toru Egashira, Shinsuke Yuasa, Keiichi Fukuda
論文標題 Induced pluripotent stem cells in cardiovascular medicine.
雑誌名 Stem cells international
査読の有無 有
巻 348960
発行年 2011年
ページ Web掲載のみで該当なし

[学会発表](計5件)

発表者名 江頭 徹 他
発表標題 Disease characterization using LQTS-specific induced pluripotent stem cells
学会名 第76回日本循環器学会
発表年月日 2012年3月16日
発表場所 福岡国際会議場(福岡県)

発表者名 江頭 徹 他
発表標題 Disease characterization using LQTS-specific induced pluripotent stem cells
学会名 Cell symposia
発表年月日 2011年12月08日
発表場所 ポルトガル リスボン

発表者名 江頭 徹 他
発表標題 Disease characterization using LQTS-specific induced pluripotent stem cells
学会名 第28回国際心臓研究会日本部会
発表年月日 2011年12月03日
発表場所 学術総合センター(東京都)

発表者名 江頭 徹 他
発表標題 Disease characterization using LQTS-specific induced pluripotent stem cells
学会名 アメリカ心臓病学会
発表年月日 2011年11月15日
発表場所 アメリカ オランダ

発表者名 江頭 徹 他
発表標題 Disease characterization using LQTS-specific induced pluripotent stem cells
学会名 第59回日本心臓病学会学術集会
発表年月日 2011年9月23日
発表場所 神戸国際会議場(兵庫県)

[図書](計3件)

著者名 江頭 徹、福田恵一
出版社名 メディカルレビュー社
書名 不整脈 2011
発行年 2011年
総ページ数 8

著者名 江頭 徹、福田恵一
出版社名 科学評論社
書名 循環器内科
発行年 2011年
総ページ数 5

著者名 江頭 徹、福田恵一
出版社名 協和企画
書名 循環器診療
発行年 2011年
総ページ数 4

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
なし

6．研究組織

(1)研究代表者

江頭 徹 (EGASHIRA TORU)
慶應義塾大学・医学部・研究員(非常勤)
研究者番号：10465023