

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790745

研究課題名(和文) 不整脈疾患モデル心筋細胞による機能解析と薬剤スクリーニングの検討

研究課題名(英文) Functional analysis and pharmacological testing of iPSc-derived cardiomyocyte as model for cardiac arrhythmia

研究代表者

木下 耕史 (Kinoshita, Koshi)

富山大学・医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：10585920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：CHIR99021とIWP-4の2種の化合物を用いて、iPS細胞から心筋細胞への誘導に成功した。従来のActivin AやBMP4等のタンパク質を用いる方法と同様に約10日で拍動が観察された。誘導した心筋細胞についてRT-PCRと免疫染色を行い、心筋細胞特異的な遺伝子やタンパク質が発現している事を確認した。KCNQ1遺伝子に変異を持つ患者より誘導した心筋細胞について、交感神経作動薬を加えた時の拍動数と活動電位変化の比較を行ったが、健常人との差は見られなかった。今後、iPS細胞由来の心筋細胞を用いて、様々な薬物負荷試験が可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in inducing cardiomyocyte from iPS cells using only two chemicals, CHIR99021 and IWP-4. Beating was detected within ten days, similar to the conventional method using Activin A and BMP4 proteins. RT-PCR and immunostaining revealed that the induced cardiomyocyte expressed cardiomyocyte-specific genes or proteins. The alterations of beat rate and field potential duration in response to the adrenergic agonist were comparable between the cardiomyocyte derived from a patient carrying a mutation in KCNQ1 gene and healthy control. Using iPS cell-derived cardiomyocyte, various pharmacological testing will become available in the future.

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 iPS細胞 QT延長 心筋誘導 薬剤応答性 疾患モデル

1. 研究開始当初の背景

先天性 QT 延長症候群(LQTS)の多くは、細胞膜上に発現するイオンチャネルの単一遺伝子変異で発症している。変異型イオンチャネルは、細胞内外のイオン濃度不均衡をもたらす致死性不整脈を発症させることもある。しかしながらその作用機序詳細は未だ不明である。

LQTS に関する遺伝子変異の機能解析は、HEK-293 細胞、CHO 細胞、またはアフリカツメガエル卵母細胞等を利用した電気生理学的手法で行われてきたが、これらの実験系は極めて人工的なものであり、ヒトの疾患が本当に再現できているか不明であった。

近年、患者由来 iPS 細胞を心筋細胞に分化させることにより、患者の病態を再現した疾患モデル心筋細胞を制限なく実験に用いることができるようになった。疾患モデル心筋細胞は不整脈発症の分子機構、また薬剤誘発性不整脈の作用機序を研究するうえで大変有用である。

2. 研究の目的

LQTS に関するイオンチャネルに変異が同定されるが臨床症状に異常がみられない例がある。これは変異型と正常型をヘテロで保持することにより、変異型の機能異常が正常型によってレスキューされていると考えられる。例えば申請者グループでは LQT1 に関連のある KCNQ1 チャネルに 1 アミノ酸置換があると I_{Ks} チャネルの膜発現量、および膜電流量が減少するが、正常型とのヘテロ発現の場合は表現型が正常型と変わらない例を報告している。このようなヘテロ発現型の変異は通常は機能異常が潜在的に隠れており、ある状況下でチャネル機能異常が顕在化し、致死性不整脈を発症する危険性が考えられる。今回申請者は、患者の iPS 細胞より心筋細胞を誘導し、心筋細胞特異的な遺伝子、タンパク発現を確認した。さらに交感神経刺激による拍動数、および活動電位持続時間の変化について正常型と比較した。薬剤応答性を iPS 細胞由来心筋細胞で行うことができれば、薬剤負荷試験をディッシュ上で行うことができ、また新薬開発にも応用できると考えられる。

3. 研究の方法

(1) iPS 細胞樹立と心筋分化誘導

末梢血採取後、単核球を単離し、抗 CD3 抗体と IL-2 刺激により、T 細胞を特異的に増殖させた。山中 4 因子はセンダイウイルスベクターにより T 細胞に感染させた。感染 T 細胞は 2 週以内に iPS 細胞へと変化する。iPS 細胞から心筋細胞への誘導には、GSK-3 阻害剤で wnt/ カテニンシグナル経路活性化に働く CHIR99021 と、wnt/ カテニンシグナル経路アンタゴニストである IWP-4 の 2 つの化合物を用いた。

(2) 心筋細胞の電気生理学的解析

心筋細胞の機能解析として、Multi Electrode Array(MEA)システムによる細胞外電位測定 (FPD)、またはパッチクランプシステムによる活動電位持続時間 (APD) の評価を行った。交感神経刺激として 受容体アゴニストであるイソプロテレノールを添加し、薬剤応答性を拍動数、FPD 変化を指標として解析した。正常型に対して交感神経刺激の感受性が高いかどうか検討するため、前述の KCNQ1 遺伝子に変異を持つ患者由来の心筋細胞を用いた。変異型チャネルを持つ患者は QT 延長がわずかにみられたが、家族歴、既往歴はなく日常生活に支障なく生活している。このような無症候性の患者に対して潜在的な不整脈リスクを明らかにできる可能性がある。

4. 研究成果

(1) iPS 細胞の樹立

本研究では、末梢血由来 T 細胞から iPS 細胞の樹立を試みた。山中 4 因子が搭載されたセンダイウイルスベクターを用いて T 細胞を初期化した。感染後、約 2 週間で未熟な iPS 細胞が出現した後、siRNA 処理でベクターを除去すると典型的な iPS 細胞が現れた。

(2) iPS 細胞の多能性評価

アルカリフォスファターゼ染色を行い、幹細胞特異的に染まることを確かめた。また、幹細胞特異的な遺伝子である Oct4、Nanog、Tra1-60、SSEA3 の発現を免疫染色により確認した (図 1)。さらに、患者特有の遺伝子変異が iPS 細胞においても再現されていることを確認した。

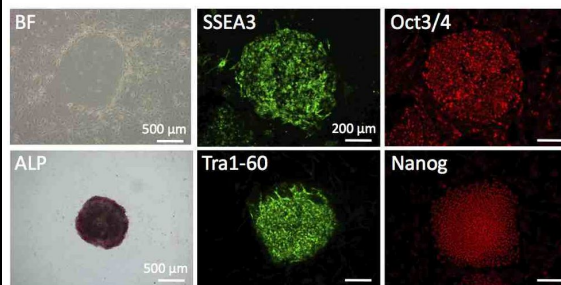


図 1 iPS 細胞の幹細胞マーカー発現

(3) 心筋細胞誘導

iPS 細胞から心筋細胞への誘導は ES 細胞時代より盛んに研究されてきたが、方法が多岐に亘っており、どの方法が最も効率が良いか分かりにくい状況であった。最も一般的であるのは BMP-4、Activin A、DKK1 等のタンパク溶液を用いた方法であるが、申請者は GSK-3 阻害剤で wnt/ カテニンシグナル経路活性化に働く CHIR99021 と、wnt/ カテニンシグナル経路アンタゴニストである IWP-4 の 2 つの化合物を用いた。化合物を用いる方がロット差や凍結保存による影響が少なく、より再現性の高い心筋誘導が行えると考えられる。具体的には、iPS 細胞をマウス胎児

繊維芽細胞非存在下で培養し、コンフルエントになった時点で誘導を開始した。培地には拍動するまで RPMI+B27 サプリメント（インスリン不含）を、拍動後は RPMI+B27 サプリメントを用いた。誘導 1 日目は CHIR99021 (8 μ M) を添加し中胚葉分化を導き、誘導 3 日目には IWP-4 (10 μ M) を添加することにより心筋細胞分化を誘導した。本方法では約 10 日で拍動する心筋細胞を確認することができた (図 2)。

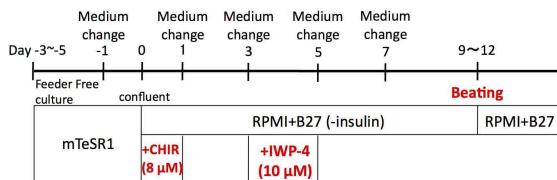


図 2 心筋細胞誘導

得られた心筋細胞に対して免疫染色を行い、心筋特異的のマーカである Actinin、TNNT2、Nkx2.5 の発現を確認した (図 3)。また、iPS 細胞と心筋細胞からそれぞれトータル RNA を調製し、心筋細胞特異的の遺伝子の発現を RT-PCR により確認した。GATA4、Nkx2.5、MYH6、MYH7、MYL2、KCNQ1、SCN5A の発現は心筋細胞でのみ確認した。TNNT2 と MYL7 に関しては iPS 細胞でもバンドが確認され、未分化の細胞でも一定量発現していることが示唆された。

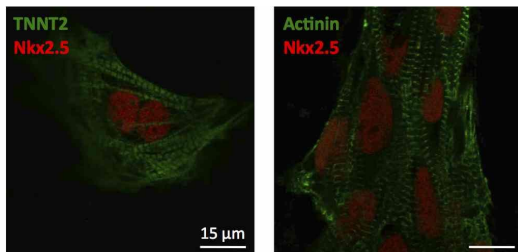


図 3 心筋マーカーの免疫染色

(4)心筋細胞の APD 測定

拍動している心筋細胞をフィブロネクチンコートした 35 mm ディッシュに移し、安定して拍動するようになるまで RPMI+B27(+insulin)培地で約 5 日培養した。測定する心筋細胞はできるだけ単一細胞で拍動しているものを選択し、自発的拍動、または 1Hz 間隔での電流刺激 (300 pA) により発生する活動電位を測定した。APD の波形により洞房結節型、心房型、心室型の 3 種類に分化していたことが判明した。しかしながら、多くの細胞の静止膜電位は -40~-50mV であり、これは生体内心筋細胞の膜電位よりも 40mV 程度浅いものであった。本結果より iPS 細胞由来の心筋細胞が生体内の心筋細胞と同等の性質を再現していない可能性が示唆される。原因として静止膜電位の形成、維持に必要な I_{K1} チャネル電流の欠落が挙げられ、チャネルを構成する Kir2.1/2.2 タンパクの遺伝子発現量を確認する必要がある。

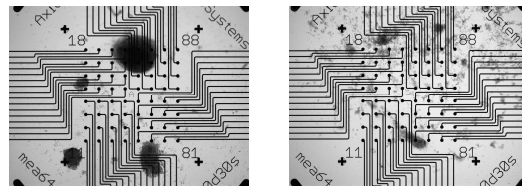


図 4 MEA 上の心筋細胞(左:塊状、右:単層)

(5)MEA システムによる心筋細胞の APD 測定

Axion 社の Maestro MEA Systems を用いて心筋細胞の FPD を測定した。本システムで用いる 12 ウェルプレートは、1 ウェルあたり $8 \times 8 = 64$ 個の電極が底面に配置され、電極直上にある心筋細胞が発生する FPD より拍動数、QT 間隔、活動電位強度、信号伝達速度等を計測できる。プレートに心筋細胞を移し、APD 測定時と同様に約 5 日培養した。最初にコントロールとして薬剤無添加時の FPD を測定し、続けて同じウェルに 10nM、30nM、100nM 濃度のイソプロテレノールを薄い濃度から添加した。薬物添加後は、十分に効果が現れるよう 10 分間インキュベータ内で静置した後、3 分間の測定を行った。測定時のみインキュベータ外の装置で行うが、37 に温められたヒートブロック上で計測する。なお、測定後は次の濃度を添加するまで 1 時間の間隔をあげた。今回、心筋細胞を播種した際に、塊になって拍動するもの (図 4 左) と、単層で拍動するもの (図 4 右) の 2 パターンが確認された。前者は FPD を計測できるものの、複数の細胞の集合体であるため、単一心筋細胞の活動電位を計測できず FPD として扱えない可能性が考えられる。また、塊状の心筋細胞よりも単層の方が、より生体に近い活動電位持続時間が得られるため、MEA システムの計測には単層の心筋細胞のデータを収集するべきであると考えられる。イソプロテレノールに対する応答は拍動数、FPD とともに健常人と患者の間に差は見られなかった (図 5)。これらの結果より、本研究で対象とした KCNQ1 変異では交感神経刺激による不整脈発症リスクは高くないことが示唆された。今後は様々な濃度における薬剤感受性を確かめる必要がある。MEA システムを利用した iPS 細胞由来心筋細胞の機能解析の報告は増えてきており、これらのデータの蓄積によって、不整脈リスクを持つ患者に対する診断精度の向上、オーダーメイド治療への進展に寄与していくものと考えられる。

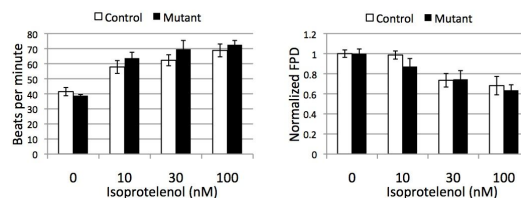


図 5 交感神経刺激による拍動数と FPD の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

1. Kinoshita K, Komatsu T, Nishide K, Hata Y, Hisajima N, Takahashi H, Kimoto K, Aonuma K, Tsushima E, Tabata T, Yoshida T, Mori H, Nishida K, Yamaguchi Y, Ichida F, Fukurotani K, Inoue H, Nishida N. (2014) A590T mutation in KCNQ1 C-terminal helix D decreases IKs channel trafficking and function but not Yotiao interaction. *J Mol Cell Cardiol.* 72, 273-280. 査読有り DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.03.019.
2. Hata Y, Mori H, Tanaka A, Fujita Y, Shimomura T, Tabata T, Kinoshita K, Yamaguchi Y, Ichida F, Kominato Y, Ikeda N, Nishida N. (2014) Identification and characterization of a novel genetic mutation with prolonged QT syndrome in an unexplained postoperative death. *Int J Legal Med.* 128, 105-115, 査読有り DOI: 10.1007/s00414-013-0853-4.
3. Kimoto K, Kinoshita K, Yokoyama T, Hata Y, Komatsu T, Tsushima E, Nishide K, Yamaguchi Y, Mizumaki K, Tabata T, Inoue H, Nishida N, Fukurotani K. (2013) Characterization of a novel mutant KCNQ1 channel subunit lacking a large part of the C-terminal domain. *Biochem Biophys Res Commun.* 440, 283-288. 査読有り DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.09.075.
4. Kinoshita K, Yamaguchi Y, Nishide K, Kimoto K, Nonobe Y, Fujita A, Asano K, Tabata T, Mori H, Inoue H, Hata Y, Fukurotani K, Nishida N. (2012) A novel missense mutation causing a G487R substitution in the S2-S3 loop of human ether- α -go-go-related gene channel. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 11, 1246-1253. 査読有り DOI: 10.1111/j.1540-8167.2012.02383.x

〔学会発表〕(計5件)

1. Takuto Komatsu, Koshi Kinoshita, Katsuya Kimoto, Yukiko Hata, Kei Aonuma, Eikichi Tsushima, Kohki Nishide, Nozomi Hisajima, Hiroyuki Takahashi, Kenkichi Fukurotani, Naoki Nishida, Toshihide Tabata. C-terminal helix D of KCNQ1 contributes to normal IKs channel function. 第91回日本生理学会大会,

2014.03.17.鹿児島

2. Koshi Kinoshita, Takuto Komatsu, Katsuya Kimoto, Kohki Nishide, Toshihide Tabata, Fukiko Ichida, Yoshiaki Yamaguchi, Kunihiro Nishida, Hiroshi Inoue, Yukiko Hata, Naoki Nishida. Functional Characterization of KCNQ1 Channel Subunit with an A590T mutation. Basic Cardiovascular Sciences (BCVS) 2013.07.22. Las Vegas
3. Kohki Nishide, Mario Kato, Yoshiaki Yamaguchi, Koshi Kinoshita, Akira Fujita, Yuki Nonobe, Yukiko Hata, Koichi Mizumaki, Hiroshi Inoue, Naoki Nishida, Toshihide Tabata. Abnormal modulation of hERG and KCNQ1 channels. 第90回日本生理学会大会, 2013.03.27. 東京
4. Katsuya Kimoto, Kohki Nishide, Koshi Kinoshita, Yuki Nonobe, Akira Fujita, Yoshiaki Yamaguchi, Yukiko Hata, Koichi Mizumaki, Hiroshi Inoue, Naoki Nishida, Toshihide Tabata. Characterization of a New Mutant KCNQ1 Channel Subunit with a C-Terminal Truncation. 第90回日本生理学会大会, 2013.03.27. 東京
5. Koshi Kinoshita, Toshihide Tabata, Fukiko Ichida, Yoshiaki Yamaguchi, Kunihiro Nishida, Hiroshi Inoue, Yukiko Hata, Naoki Nishida. Characterization of KCNQ1 (Kv7.1, IKs) channel subunit with an A590T mutation. 第77回日本循環器学会学術総会, 2013.03.15. 横浜

〔その他〕

研究室ホームページ

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 耕史 (KINOSHITA KOSHI)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・
法医学講座・助教

研究者番号: 10585920

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし