

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461051

研究課題名(和文) 遺伝性不整脈患者iPS細胞由来心筋細胞を用いた薬物誘発性QT延長症候群の病態解明

研究課題名(英文) Analysis of drug-induced long QT syndrome using iPS cell-derived cardiomyocytes of inherited arrhythmic patients

研究代表者

丹羽 良子 (NIWA, RYOKO)

名古屋大学・環境医学研究所・研究員

研究者番号：00216467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝的不整脈疾患Andersen症候群患者由来のiPS細胞から分化誘導した心筋細胞を用い、病態の解明と有効な薬剤の検索を行った。多電極アレイを用いた解析にて、疾患群で不整な細胞外電位と異常な細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を認めた。これらはフレカニド(FL)で抑制され、他のNaチャンネル抑制剤で抑制されなかった。NaCa交換系(NCX)のreverse mode阻害剤KB-R7943にて異常な細胞内Ca濃度上昇は抑制され、FLはNCX電流を増大した。以上より、Andersen症候群でFLはNCXを介して不整脈を改善すると考えられ、疾患特異的なiPS細胞は病態の解明や新しい治療法の開発に有益と考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to investigate cardiac pathogenesis and effective treatment in Andersen syndrome, a rare inherited channelopathy, using specific induced pluripotent stem cell (iPSC).

We reprogrammed somatic cells from three ATS patients carrying the KCNJ2 mutations to generate iPSCs. Multi-electrode arrays (MEAs) revealed strong arrhythmic events in the ATS-iPSC-derived cardiomyocytes. Using Ca<sup>2+</sup> imaging, we found a significantly higher incidence of irregular Ca<sup>2+</sup> release in the ATS-iPSC-derived cardiomyocytes. Flecainide, but not the sodium channel blocker, pilsicainide, suppressed these irregular Ca<sup>2+</sup> release and arrhythmias, suggesting that the effect was not via sodium channels blocking. A reverse-mode Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-exchanger (NCX) inhibitor, KB-R7943, was also found to suppress the irregular Ca<sup>2+</sup> release, and whole-cell voltage clamping of isolated guinea-pig ventricular myocytes confirmed that flecainide directly affect the NCX current.

研究分野：心臓電気薬理

キーワード：遺伝性不整脈 iPS細胞 薬物誘発性 QT延長症候群 イオンチャンネル

## 1. 研究開始当初の背景

ごく一般的な薬物の使用により、主たる薬効とは無関係に心電図 QT 時間が延長し致死性不整脈を招くことがよく知られている。この薬物誘発性 QT 延長症候群は、徐脈、房室ブロック、電解質異常などに伴って発症することが多い。しかしながらその発症には個人差が多く、これら環境因子のみでは説明できない点が多い。個人差が生じる説明として、心筋 K チャンネル (IKr, IKs) あるいは Na チャンネルの遺伝子変異、SNP などのイオンチャンネル遺伝子異常が潜在的なイオンチャンネル機能障害をもたらしており、徐脈、房室ブロック、電解質異常など環境因子の変化によりチャンネル機能障害が顕在化すると推定されている。しかしながら、現在行われている、異常チャンネル遺伝子の発現電流に対する機能解析やそれに基づく薬物チャンネル相互作用の 3 次元シミュレーションモデル解析の手法では、この仮説を検証できるに至っていない。

Andersen 症候群など、遺伝性の不整脈疾患の中には、その不整脈発生機序が不明なため有効な治療方法が不明であることが多い。京都大学山中らの技術によりヒト線維芽細胞から iPS 細胞を樹立することが可能となり、慶應義塾大学福田らはさらに末梢血 T リンパ球よりヒト iPS 細胞を樹立してから心筋細胞への分化誘導にも成功している (Seki T ら、Cell Stem Cell 2010)。健常者や遺伝子疾患を有する心疾患患者のヒト心筋細胞が使用でき電気生理学的および収縮特性の解析ができれば、これらの心疾患の病態解明と治療法の開発が飛躍的に進歩することになる。本研究では、健常人と LQT7 (Andersen 症候群) 等患者から樹立した iPS 細胞株を心筋細胞に分化誘導し、遺伝子異常による潜在的イオンチャンネル機能障害と薬物の相互作用の解析から、疾患特異的な治療法の発見・開発をめざす。

## 2. 研究の目的

遺伝子異常による不整脈患者から iPS 細胞を樹立し、さらに心筋細胞を分化誘導して、生体に近い状態で疾患特異的な不整脈の発生機序やその治療法を解析する。Andersen 症候群は、心室不整脈、周期性四肢麻痺、骨格異常を三徴とする遺伝性疾患であり、KCN2 遺伝子異常によりコードする Kir2.1 (内向き整流 K チャンネル) に変異を生じ、IK1 電流の減少が心電図 U 波と特徴的な二方向性の心室期外収縮をもたらす。機序としては、細胞内

Ca 濃度の局所的な上昇により異常な膜電位振動とそれによる遅延後脱分極が推定されているが、今日に至るまでそれを実証し治療法に結びつけた報告はない。

## 3. 研究の方法

健常人と Andersen 症候群患者の皮膚線維芽細胞もしくは末梢血 T リンパ球より iPS 細胞を樹立し、心筋細胞に分化誘導する。上記ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を使用し、イオンチャンネルの電気生理学的性質を解析する。MEA (多電極アレイ) を用いた細胞外電位測定と Ca 蛍光指示色素 Fluo-4 を用いた細胞内 Ca 動態の解析により、不整脈の発生様式とその薬物による制御を解析する。

## 4. 研究成果

本研究計画 3 か年で、Andersen 症候群の患者から樹立した iPS 細胞を用い、その不整脈原生の機序とその治療法について検討した。Andersen 症候群患者について、遺伝子変異の判明している 3 名 (KCNJ2R218W、KCNJ2R67W、KCNJ2R218Q) について iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞を用いて、その機序と薬剤を用いた治療法について検討した。MEA (多電極アレイ) を用いた細胞外電位測定と Ca 蛍光指示色素 Fluo-4 を用いた細胞内 Ca 動態解析により、世界に先駆けて細胞内 Ca 過負荷状態が Andersen 症候群に伴う不整脈発生機序であることを示した。また抗不整脈薬フレカナイドは、これら疾患群で認められる不整な細胞外電位及び異常な細胞内カルシウム濃度  $[Ca^{2+}]$  上昇を共に抑制することを見出した。さらにナトリウム・カルシウム交換系 (NCX) の reverse mode を阻害する KB-R7943 により、異常な細胞内カルシウム濃度上昇は抑制され、フレカナイド投与後に NCX 電流を増大させることが明らかとなった。これらの結果により Andersen 症候群においてフレカナイドは NCX を介して不整脈を改善させる可能性が示唆され、疾患特異的な iPS 細胞は病態の解明や新しい治療法の開発に有益なツールと考えられた。

iPS 細胞間の性質にはばらつきがあり、この問題の解決には iPS 細胞クローンの樹立法や評価・選別法の確立が必要と考えられた。iPS 細胞由来心筋の品質においても問題点が存在するが、疾患遺伝子変異が保存されたヒト心筋細胞を用いて得られる知見も有益と考えられる。今回我々も、NCX 電流をモルモ

ット心室筋で測定して iPS 細胞由来心筋で得られた結果を確認したが、このようにほかの実験系を併用して総合的に解釈することで結果の精度を高めることができると考えた。

これらの知見は、2017 年 1 月刊行の Biochemistry and Biophysics Reports に掲載され、平成 29 年 3 月日本循環器学会総会の Featured Research にも採択された。

#### 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 2 件)

Kuroda Y, Yuasa S, Watanabe Y, Ito S, Egashira T, Seki T, Hattori T, Ohno S, Kodaira M, Suzuki T, Hashimoto H, Okata S, Tanaka A, Aizawa Y, Murata M, Aiba T, Makita N, Furukawa T, Shimizu W, Kodama I, Ogawa S, Kokubun N, Horigome H, Horie M, Kamiya K, Fukuda K:

Flecainide ameliorates arrhythmogenicity through NCX flux in Andersen-Tawil syndrome-iPS cell-derived cardiomyocytes.

Biochemistry and Biophysics Reports 9: 245-256, 2017. 査読有

DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.01.002

Kushiyama Y, Honjo H, Niwa R, Takanari H, Yamazaki M, Takemoto Y, Sakuma I, Kodama I, Kamiya K:

Partial IK1 blockade destabilizes spiral wave rotation center without inducing wave breakup and facilitates termination of reentrant arrhythmias in ventricles.

American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology 311:

H750-H758, 2016. 査読有

DOI: 10.1038/srep34198.

##### [ 学会発表 ] (計 10 件)

Kuroda Y: Flecainide suppresses an arrhythmogenic substrate in Andersen-Tawil syndrome-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. ESC Congress, 2016 年 8 月 28 日、Rome, Italy

Ogawa T: Roles of late INa-mediated focal electrical activities in ventricular tachyarrhythmia associated

with acute myocardial ischemia. ESC Congress, 2016 年 8 月 28 日、Rome, Italy

Kamiya K: The role of gap junctions in stretch-induced atrial fibrillation. The 8th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Sessions, 2015 年 11 月 20 日、Melbourne (Australia)

黒田 裕介: ヒト iPS 細胞を用いた Andersen 症候群の解析. 第 28 回東海心血管再生代謝研究会、2015 年 6 月 19 日、名古屋

Kamiya K: Optical mapping system unites the cellular electrophysiology and in-vivo cardiac arrhythmias. The 79th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2015 年 4 月 25 日、大阪国際会議場 (大阪)

Kuroda Y: Disease modeling of long-QT syndrome type 7 using patient-specific iPS cells. The 79th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2015 年 4 月 25 日、リーガロイヤルホテル大阪 (大阪)

Kuroda Y: Reverse-mode Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger inhibitor suppresses an arrhythmogenic substrate in Andersen-Tawil syndrome-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes.

The 62nd Annual Scientific Session of the Japanese College of cardiology、2014 年 9 月、川内萩ホール (仙台)

Kuroda Y: Disease modeling for Andersen-Tawil syndrome using patient-specific iPS cell. The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2014 年 3 月 22 日、東京国際フォーラム (東京)

Suzuki T: Uncovering the pathophysiology of short-coupled variant of torsade de pointes by disease specific-included pluripotent stem cells. The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2014 年 3 月 22 日、東京国際フォーラム (東京)

神谷 香一郎: 不整脈の可視化. 第 6 回東海循環器研究会、2013 年 12 月 (名古屋)

〔図書〕(計1件)

黒田 裕介: 心疾患と疾患特異的 iPS 細胞. Medical Science Digest 39  
(11) :2013 年、4

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

丹羽 良子 (NIWA RYOKO)  
名古屋大学・環境医学研究所・研究員  
研究者番号 : 00216467

### (2)研究分担者

神谷 香一郎 (KAMIYA KAICHIRO)  
名古屋大学・環境医学研究所・教授  
研究者番号 : 50194973