

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461607

研究課題名(和文) 未知の遺伝子変異を有するQT延長症候群患者への安全な治療方針決定プロトコルの開発

研究課題名(英文) Development of a safe and high-throughput diagnosis protocol for long QT syndrome by using iPS cells.

研究代表者

馬場 志郎 (Shiro, Baba)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60432382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：QT延長症候群は致死性不整脈を誘発する不整脈疾患である。13-14の型に分類されるが、90%以上がQT延長症候群1～3型に分類される。各々の型によって投薬や生活指導も全く異なるが、現在行われている型分類のための診断方法は遺伝子検査のみである。しかし、遺伝子の多型や遺伝浸透率の問題から、遺伝子以上が判明しても患者の症状と直接結びつくことが証明されるものはごくわずかである。我々は患者さんのiPS細胞由来心筋細胞を用いて、異常が起こるイオンチャネルを簡単に調べることで型分類する診断方法を確立した。この診断方法により、より簡便に異常チャネルに基づいた診断が可能となり、正確に薬物選択や生活指導が可能となる。

研究成果の概要(英文)： Long QT syndrome (LQTS) is caused by hereditary cardiac channelopathies characterized by prolonged QT interval on an electrocardiogram. LQTS may precipitate malignant arrhythmia, resulting in syncope and sudden death. Genetic testing is currently utilized to assist treatment selection and prognostication with limited success. The predicted phenotype of the genetic abnormality often does not match the clinical phenotype due to low penetrance and variable expressivity of the syndrome.

we used LQTS patient-specific induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived cardiomyocytes (iPSC-CMs) and multi-electrode array (MEA) as a diagnostic platform for high-throughput in vitro phenotype screening. From our experimental results, a diagnosis protocol using iPSC-CM and MEA system may enable evaluation of channelopathies more accurately than genetic testing alone and to avoid ethical problems arising from revealing individual genes.

研究分野：小児循環器学

キーワード：QT延長症候群 iPSC細胞 新規診断方法

1. 研究開始当初の背景

QT 延長症候群は致死性不整脈を引き起こす心電図異常症候群であり心電図上の QT 時間または心拍補正された QT 時間 (QTc 時間) 延長 (460msec 以上) で診断されるが、QT 延長機序は様々である。最も大きな原因は先天性の心筋細胞膜上イオンチャネル遺伝子変異 (先天性 QT 延長症候群) であり、異常イオンチャネルの種類などにより約 13 の病型に分類される。これら遺伝子変異は、DNA シークエンスを含めた遺伝子解析で検索でき、その結果は、患者個人の生活管理指導や治療薬剤決定において重要である。しかし、以上に述べた病型診断の重要性にもかかわらず、以下に述べる 3 つの理由により正確な病型診断が困難となっている。まず 1 つ目は遺伝子検査を希望する患者は全先天性 QT 延長症候群の一部であり、患者自身の信念、将来的な結婚や家系、親族間関係などの複雑な問題から希望しない場合が多い。特に小児患者では、異常が見つかった場合に親が子どもに伝えるかどうか、伝えない場合の親の守秘による責任など考えて、ほとんどの親は自身の子どもの遺伝子検査を希望しない。2 つ目は、先天性 QT 延長症候群の 90% 以上を占める 1~3 の病型中、遺伝子変異は、Ackerman MJ らの報告では (Heart Rhythm. 2:507-517;2005) 209 の報告がある。これら遺伝子変異の中で、細胞電気生理学的にイオンチャネル異常が証明されたものは一部である。3 つ目は、QT 時間延長を認め、遺伝子検査を受けた患者の中で遺伝子変異が見つかる確立は 70% 程度である。これらの問題から、遺伝子検査を希望しない患者、細胞電気生理学的に証明されていない遺伝子変異を有する患者、遺伝子変異が見つからなかった患者に対して安全且つ簡便に行なえる、適切な生活管理指導や治療薬剤を決定するプロトコルの開発が必要である。

遺伝子検査を行わない病型診断 (特に病型の 90% 以上を占める 1~3 型に対して) はイソプロテレノールやアドレナリン投与による薬剤負荷テスト (負荷前後の心電図変化解析) で可能であることが Kawade M らによって報告された。(Br Heart J. 74:67-70;1995) 更にその後、Ackerman MJ らによってエピネフリン投与による薬剤負荷テストが同様に QT 延長症候群の病型診断に有用であることが報告されている。(Circulation. 113:1385-1392;2006) これらの方法は、致死性不整脈発生や QT 時間延長を抑制する治療薬剤を併用することで、患者個人に有効な治療薬剤選択が可能となる。しかしこれらの方法は、患者自身に薬剤ストレス負荷をかけるだけでなく、致死性不整脈誘発の可能性も否定できず、安全な薬剤負荷テストと言い難い側面を有する。

2007 年に Yamanaka S らによってヒト皮膚線維芽細胞から線維芽細胞由来人工万能細胞 (iPS 細胞) が作成できることが報告され

た。(Cell. 131:861-872;2007) この iPS 細胞を先天性 QT 延長症候群患者から作成し、心筋分化すれば、先天性 QT 延長症候群患者と同じ遺伝的背景を持つ心筋細胞が作成できる。この細胞を用いて薬剤負荷テストを行えば、病型診断だけでなく、生活管理指導方法の決定や有効治療薬剤の選択がより安全に可能である。

2. 研究の目的

QT 延長症候群患者由来 iPS 細胞から心筋細胞を作成し、High-throughput でかつ安全、簡便な薬剤負荷テストを施行することを目的とする。そのため、イオンチャネル異常に準じた QT 延長症候群 新規診断方法を開発し、その延長線上で、正しい治療や生活管理を行うことを目指す。

3. 研究の方法

QT 延長症候群患者 (LQT) の 90% を占める 1~3 型の患者から作成した iPS 細胞は各患者の皮膚線維芽細胞から retrovirus を用い、Sox2, Klf4, Oct4, c-Myc を導入して作成したものが既に当教室に入手済みである。その内訳は、1 型 (LQT1 iPS) は別々の患者から作成した iPS 細胞 2 株 (1 細胞株は既知の遺伝子変異、もう 1 細胞株は新規変異)、2、3 型 (LQT2 iPS, LQT3 iPS) は既知の遺伝子変異を有する iPS 細胞 各々 1 株、これに加えて 2 名の健常人から作成した Control iPS 細胞 (Control iPS) 各々 1 株を有する。LQT2、LQT3 の細胞株については細胞電気生理学的実験で既に各々 I_{Kr} , I_{Na} イオンチャネル異常を有することが証明されている。(Spencer CI et al. Stem Cell Reports 2014;3(2):269-281) 以上の研究材料を利用して実験計画をたてた。

【細胞維持培養】

iPS 細胞の未分化維持培養は、Matrigel コートした培養皿上で mTeSR1 (Stem Cell Technologies) を用いて行なった。細胞継代は、Accutase (Thermo Fisher Scientific) で細胞を剥離し、細胞死を抑制するために、継代初日のみ $10 \mu\text{M}$ ROCK inhibitor を含有した mTeSR を使用した。

【細胞分化方法】

心筋分化方法は、Lian X らが報告した心筋分化方法 (Nat Methods. 2015;12(7):595-596) (GiWi protocol) と、Tohyama S らが報告した心筋細胞純化方法 (Cell Stem Cell. 2013;12(1):127-137) で心筋細胞を作成・純化した。簡単に記述すると、未分化 iPS 細胞を継代培養 3 日後に $12 \mu\text{M}$ CHIR99021 (Selleckchem) 含有 RPMI/B27 minus insulin (Thermo Fisher Scientific) に培養液を替え、更に 24 時間後に培養液を RPMI/B27 minus insulin に切り替えた。分化開始 3 日後に $5 \mu\text{M}$ IWP2 (Tocris) 含有 RPMI/B27 minus insulin に替え、分化 7 日目から 3-4 日毎に RPMI/B27 minus insulin の培養液を交換した。心筋分化

23-29 日頃に低 Glucose 且つ Lactate 含有培地で心筋細胞を純化した。分化心筋細胞は、分化後 50-90 日頃のものを使用した。

【免疫染色】

細胞や組織は 4%パラホルムアルデヒド (WAKO)で細胞固定した。細胞膜の穿孔は、0.1%Tween を用いて行った。未分化 iPS 細胞は未分化性確認のために、抗 Oct3/4 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、抗 TRA-1-81 抗体 (Millipore) を一時抗体として用いた。心筋分化は、抗 Cardiac Troponin 抗体 (Thermo Scientific)、Myosin Light Chain 2v (MLC2v) (Synaptic Systems)、Myosin Light Chain 2a (Protein tech Group Inc.) を一時抗体として使用した。二次抗体は、Alexa Fluor 488, 568 donkey anti-mouse IgG (Life Technologies) Cy3 donkey anti-goat IgG (Jackson Immuno Research)を使用した。

【フローサイトメトリー】

iPS 細胞からの分化心筋細胞は BD Cytoperm/cytech で 20 分間固定し、抗 Cardiac Troponin 抗体 と Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG、FACS Verse (BD science)を用いて行った。

【遺伝子改変】

LQT 患者から作成した iPS 細胞のまったく同等の遺伝バックグラウンドを持ったコントロールを作成するために、遺伝子転位箇所を修正した iPS 細胞を、CRISPR/Cas9 システムを用い、Control iPS 細胞を作成した。【テラトーマ作製】

未分化 iPS 細胞を Matrigel 含有 mTeSR1 培養液に懸濁し、NOD/SCID マウスの精巢に注射して寺ローマを作製した。

【Multi-electrode Array (MEA) System】

分化心筋の活動電位は、分化心筋細胞を電極植込み型培養皿に移し Multi-electrode System (MEA システム (MED64 システム): Alpha MED Scientific)を用いて行なった。活動電位時間は、心筋細胞収縮開始の Spike からその次の陽性または陰性波のピークまでの時間 (Field Potential Duration (FPD)) を測定し、活動電位時間として評価した。なお、FPD は心筋細胞拍動頻度で変化することが予測されるために、Friedricia 補正によって補正した (FPDc)。活動電位時間はナトリウム (I_{Na}) の阻害剤・活性化剤、カリウム (I_{Ks} I_{Kr}) チャネルの阻害剤投与前後で測定し、活動電位時間の変化を計算した。なお、 I_{Na} チャネル活性化剤は AT-II、阻害剤はテトロドトキシン (TTX) I_{Ks} チャネル阻害剤は Chromanol293B、 I_{Kr} チャネル阻害剤は E4031 を用いた。なお、MEA システムでの活動電位測定時は、10% Fetal Calf Bovine (FCS)含有 RPMI/B27 insulin 培地を用いて行なった。

【パッチクランプ】

心筋細胞上のイオンチャネルの電流についてはパッチクランプ法を用いて測定した。KOH で pH 7.4 に調整した Tyrode (電解質液) で実験を行った。細胞の電位は Whole-cell パ

ッチクランプ法で行った。

4. 研究成果

【未分化 iPS 細胞】

未分化 iPS 細胞は未分化形態を維持しながら培養可能であった。LQT1, 2, 3、コントロール iPS 細胞、遺伝子改変した LQT2 iPS 細胞について免疫染色を行ったところ、いずれの細胞も Oct3/4、TRA-1-81 を十分発現しており、未分化性が確認できた。また、いずれの細胞の核型も正常であった。多分化能について確認するためにテラトーマを作製したが、いずれの iPS 細胞からも精巢内に主流が形成され、ヘマトキシリン・エオジン染色で、腸管上皮様細胞、軟骨様細胞、神経様細胞が確認され、多分可能を有することが判明した。

【心筋分化】

LQT1, LQT2, LQT3, Control iPS 細胞から心筋細胞を作成した。Cardiac Troponin 染色、FACS 解析の結果、分化細胞の 80-90%以上が心筋細胞であることが証明された。心房筋・未分化心筋マーカーである MLC2a と心室筋マーカーである MLC2v を用いた実験では、作成した心筋細胞の 90%以上が心室筋のマーカーを発現しており、活動電位の測定実験に十分であることが証明された。

【LQT2 iPS 由来心筋細胞の I_{Kr} 電流】

まず、CRISPR/Cas9 で Control iPS 細胞が作製できた LQT2 について評価を開始した。パッチクランプ法を用いて I_{Kr} 電流を測定したところ、Control iPS 由来心筋細胞に比べて LQT2 iPS 由来心筋細胞で有意に I_{Kr} 電流が低下していた。遺伝子改変した Control LQT2 iPS 由来心筋細胞についても I_{Kr} 電流を測定したところ、有意に I_{Kr} 電流が正常化しており、LQT2 iPS 細胞のコントロールとして十分使用可能であることが証明された。

【MEA System による細胞外電位】

LQT2 iPS 由来心筋細胞と Control iPS 由来心筋細胞の活動電位を MEA System を用いて計測した。Control iPS 由来心筋細胞に比べて LQT2 iPS 由来心筋細胞で有意に臨床心電図での QT 時間に対応する FPDc が延長しており、iPS 細胞を作製した患者の臨床的特徴が細胞実験レベルでも再現できることが証明された。この FPDc を E4031 投与下で記録し、投与前後の FPDc の変化率を計算した。結果、Control iPS 由来心筋細胞に比べて LQT2 iPS 由来心筋細胞で有意に E4031 投与後の FPDc 延長率は低かった。つまり、LQT2 iPS 由来心筋細胞の FPDc (臨床上の QTc) は、 I_{Kr} チャネル機能異常 (低下) によって既に延長しており、活動電位の再分極に大きく寄与しないため、E4031 投与下でも活動電位時間にそれほど影響しなかったことが考えられた。逆に、Control iPS 由来心筋細胞は、 I_{Kr} チャネルが正常であるために I_{Kr} 電流の活動電位の再分極に対する寄与は大きい。よって、E4031 投与下で FPDc が有意に長く延長したと考えられた。次に LQT2 iPS 由来心筋細胞と Control iPS

由来心筋細胞に対してChromanol293B投与前後でFPDcの延長率を比較した。結果、Chromanol293B投与前後でいずれのFPDcも同等レベルで十分延長しておりFPDc延長率に有意差は認めなかった。これは、LQT2 iPS由来心筋細胞、Control iPS由来心筋細胞ともに活動電位の再分極に I_{Ks} 電流が十分寄与している、つまり I_{Ks} 電流はいずれも正常であることが証明された。

以上の考察のもとにLQT1 iPS由来心筋細胞のChromanol293B投与前後のFPDcをMEAシステムを用いて測定した結果、FPDc延長率は、Control iPS由来心筋細胞の方がLQT1 iPS由来心筋細胞に比べて有意に延長していた。この結果は、パッチクランプ法を用いても同様の結果が得られた。LQT1 iPS由来心筋細胞とControl iPS由来心筋細胞に I_{Kr} 阻害剤であるE4031を投与すると、いずれも同等にFPDcの延長を認め、これらの延長率に有意差は認めなかった。以上の結果から、LQT1 iPS由来心筋細胞は I_{Ks} の機能低下異常を有するために I_{Ks} の活動電位の再分極に対する寄与の程度が低いため、Chromanol293Bの投与においても(機能低下している I_{Ks} チャンネルを更にブロックしても)FPDcの変化が小さいと考えられた。逆に、活動電位に対する I_{Kr} チャンネルの寄与は十分であるために、Control iPS由来心筋細胞と同様にE4031の投与においてFPDc延長が認められた。LQT3 iPS由来心筋細胞とControl iPS由来心筋細胞に対して、 I_{Na} 活性化作用があるAT-IIを投与前後でMEAシステムを用いて活動電位を測定した。結果、LQT3 iPS由来心筋細胞の活動電位はControl iPS由来心筋細胞に比べて有意に活動電位の延長を認めた。LQT3は I_{Na} の機能亢進であり、AT-II投与によって活動電位の延長は少ないと考えていたが、更なる延長を認める結果となった。この結果については現在考察、追加実験計画検討中である。

以上の、LQT1, LQT2, LQT3 iPS由来心筋細胞のMEA Systemを用いた活動電位変化の結果から、簡便でhigh-throughputなMEA Systemを用いたイオンチャンネルによるLQTの分類診断が可能と考えられた。

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 0件)

Vassilios J. Bezzerides, Aifeng Zhang, Vassilios J. Bezzerides, Aifeng Zhang, Ling Xiao, Bridget Simonson, Santosh A. Khedkar, Shiro Baba, Filomena Ottaviano, Stacey Lynch, Katherine Hessler, Alan C. Rigby, David Milan, Saumya Das and Anthony Rosenzweig.

Inhibition of serum and glucocorticoid regulated kinase-1 as novel therapy for cardiac arrhythmia disorders.

[学会発表](計 1件)

馬場 志郎 (BABA, Shiro)

2015年8月 西日本小児循環器研究会、東京
「QT延長症候群 iPS細胞を用いた新規QT延長作用機序解析」

吉永 大介 (YOSHINAGA, Daisuke)

2017年6月 国際幹細胞学会 (International Society of Stem Cell Research Annual Meeting, Boston USA)

“Development of a high-throughput diagnostic protocol for channelopathy by using LQT iPSC-derived cardiomyocytes.”

吉永 大介 (YOSHINAGA, Daisuke)

2017年7月 日本小児循環器学会、浜松
演題発表予定

「iPS細胞を用いたQT延長症候群への診断利用」

馬場 志郎 (BABA, Shiro)

2017年7月 日本小児循環器学会、浜松
演題発表予定

「疾患特異的 iPS細胞を用いた致死性不整脈の研究」

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

馬場 志郎 (BABA, Shiro)

京都大学医学部附属病院 小児科・助教

研究者番号: 6 0 4 3 2 3 8 2

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

吉永 大介 (YOSHINAGA, Daisuke)

京都大学医学部附属病院 小児科・医員