

201128241A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

ヒトiPS細胞を用いた致死的循環器疾患の病態解明と  
治療方法の開発に関する研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 湯浅 慎介

平成24(2012)年 5月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

ヒトiPS細胞を用いた致死的循環器疾患の病態解明と  
治療方法の開発に関する研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 湯浅 慎介

平成24（2012）年 5月

# 目次

## I. 総括研究報告

ヒトiPS細胞を用いた致死的循環器疾患の病態解明と  
治療方法の開発に関する研究  
湯浅慎介

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表

## III. 研究成果の刊行物・別刷

ヒトiPS細胞を用いた致死的循環器疾患の病態解明と  
治療方法の開発に関する研究

研究代表者 湯浅慎介 慶應義塾大学医学部 特任講師

研究要旨

我が国における心臓突然死は年間3万～5万人とされ、致死的循環器疾患を早期に診断し、適切な治療方法を開発する方法を確立することが急務である。近年、本邦においてiPS（人工多能性幹細胞）細胞が開発され、疾患解析・新規治療方法の開発が期待されている。iPS細胞は、患者のゲノムに記録されている全ての遺伝情報を受け継いだ多能性幹細胞であり、分化することにより患者の病気表現型を引き継いだ生きたヒト心筋細胞を作製することが可能である。ヒトiPS細胞の一般的な作成方法は皮膚生検を行い、皮膚線維芽細胞を樹立し、レンチウイルスおよびレトロウイルスによりES細胞特異的転写因子の遺伝子導入を行いiPS細胞の樹立を行う。我々は非侵襲的で簡単なヒトiPS細胞の樹立方法を開発する必要があると考え、ヒト末梢血を用いた非侵襲的で簡便なiPS細胞樹立方法を開発し報告してきた（Cell Stem Cell, 2010）。多くの臨床研究などで示されてきているように、疾患解析において病気の原因を同定し新規治療方法を開発する際に症例数が少ないと間違った結果に導かれることがある。如何にして多くの患者から疾患解析をするかが重要な課題である。本研究では、致死的循環器疾患患者より同意のもと、末梢血10ml程度を採取しiPS細胞を作製する。その後、心筋細胞へ分化誘導することで病的な心筋を作り、表現型の解析、薬剤への反応を確認することで、多くの致死的循環器疾患を対照にした病態解明と新規治療方法の開発とその臨床応用を行っていく。

A. 研究目的

iPS細胞を用いた致死的循環器疾患の病態解明と新規治療方法の開発は、理論上は既に可能な研究と考えられており開始されている。しかしながら、実際は患者の侵襲度の高い皮膚生検の必要性などの点で解決されていない問題があり、当初思われていたように研究は進んでいない。我々の開発したヒト末梢血からのiPS細胞樹立方法の開発により、患者の侵襲度とiPS細胞樹立にかかわる煩雑さは解決された。

致死的循環器疾患としては突然死症候群として知られている心筋イオンチャンネル遺伝子の突然変異による先天性QT延長症候群患者よりiPS細胞を樹立し疾患解析を行っている。これらの疾患は根本的な治療方法はなく対処療法を行うことしかできず、突然死を防ぐ根本的な手立てがない。これらの患者からiPS細胞を作製し心筋細胞に分化することで、ヒトの生きた心筋細胞での致死的循環器疾患モデルの構築が可能となり、疾患解析と新規治療方法の開発が可能となる。オーダーメイド医療の実現が望まれている現在、個々の患者に合わせた薬効の評価も可能となり、より患者にあった治療法を提供することが可能となる。

B. 研究方法

iPS細胞樹立に関して、患者の負担軽減のために我々の開発した末梢血を用いた方法を全例で用いる。T細胞はヒト末梢血から分離した単核球細胞を培養皿上でCD3抗体とIL2にて刺激し、5日間ほど培養するとT細胞は選択的に増殖しコロニーを形成してくる。センダイウイルスは活性化した細胞に選択的に感染・遺伝子導入されるために、同条件ではT細胞に選択的に感染する。患者から採血後、全単核球細胞の培養からのT細胞活性化を行いセンダイウイルス感染、iPS細胞樹立を行う。本法は手技が単純であり、高い再現性を備えた方法となり確実に患者iPS細胞を樹立することが可能である。

心筋細胞分化誘導に関しては、ヒトES細胞と同様にヒトiPS細胞も浮遊培養させることで胚様体を形成し、胚様体のまま培養を続けることで1～3週間で自己拍動を呈する細胞塊が得られる。我々は、これまでに胚様体に機能的な心筋細胞が存在することが証明してきた。拍動する細胞塊を選別し、RT-PCR、免疫染色等により各種心筋マーカー、イオンチャンネル



の発現と心筋細胞として典型的な形態を有するを確認する。

心筋活動電位の解析としては、拍動する胚様体をin-vitro多点電位記録システムであるMEAシステムのマルチ電極アレーディッシュに乗せると、1~2日で接着し、底面の電極で活動電位（細胞外電位）を記録することが可能となる。この実験系を用いて、最初に基準状態での細胞外電位を計測し健常コントロールと比較し、患者に存在する疾患がin vitroにおいて再現されているかを解析する。EADの出現などをもとに、患者ごとにin vitroで疾患表現系が再現されるか、あるいはどのような刺激が悪影響を及ぼすかが予測可能であるかを検討していく。

### C. 研究結果

我々は先天性QT延長症候群1, 2, 3, 7型等の患者からiPS細胞を作製した。各疾患を対象に数人以上、一人の患者当たり10細胞株程度のiPS細胞株を作製し、凍結保存の上で、解析を行っている。これまでに行ってきた研究結果としては、『①患者由来iPS細胞の作製；各細胞株における幹細胞マーカーの発現を免疫染色、RT-PCRにおいて確認。多分化能を奇形腫形成とin vitroにおける三胚葉分化を確認。

②患者由来iPS細胞からの心筋細胞分化誘導；分化細胞における各種心筋細胞マーカーの発現を免疫染色とRT-PCRにおいて確認。③患者由来iPS細胞由来心筋細胞を用いた電気生理学的検討；MEA(Multi-Electrode Array), Patch Clamp法により患者固有の病態（QT延長に相当するMEA上のFPD(Field potential duration)延長、疾患原因のチャネル機能異常の確認）が再現されていることを確認。④同心筋細胞に各種薬剤（カテコラミン、イオンチャネル阻害剤等）を添加し電気生理学的解析を行うことにより、患者固有の病気発症の原因解明（カテコラミンに対する心筋細胞の電気的不安定性の出現または消失、イオンチャネル阻害剤による病態（MEAにより心室性不整脈様の不整脈出現）の改善や増悪）と、新規治療方法の開発』を順次行っている。

### D. 考察

ヒトiPS細胞は、様々な年齢層の致死性循環器疾患を有する患者より少量末梢血から樹立可能であることが確認できた。また同iPS細胞は心筋細胞に分化誘導可能であり、様々な不整脈疾患の病気表現系が再現され、各種解析が可能であることを確認した。これまではスクリーニング系構築のための基盤技術の構築を行っており、今後は未知の病態や新規治療法

の開発を行っていく。

### E. 結論

本研究により、各種遺伝性致死的不整脈疾患の病態はiPS細胞を用いることにより再現可能であることが確認された。また同細胞を用いて、様々な薬剤評価も可能であることが確認された。今後はiPS細胞を用いた評価系により革新的治療方法の開発が望まれる。

### F. 研究発表

- 論文発表（2011年度）
1. Seki T, Yuasa S, Fukuda K, Generation of induced pluripotent stem cells from a small amount of human peripheral blood using a combination of activated T cells and Sendai virus. *Nature Protocols*. 2012 Mar 15;7(4):718-28.
2. Maekawa Y, Kawamura A, Yuasa S, Ohno Y, Arai T, Fukuda K. Acute coronary syndrome or apical ballooning syndrome? *Heart Vessels*. 2012 Mar 6.
3. Maekawa Y, Kawamura A, Yuasa S, Nesto RW, Fukuda K. Direct comparison of Takotsubo cardiomyopathy between Japan and USA: 3-year follow-up study. *Intern Med*. 2012;51(3):257-62.
4. Onizuka T, Yuasa S, Kusumoto D, Shimoji K, Egashira T, Ohno Y, Kageyama T, Tanaka T, Hattori F, Fujita J, Ieda M, Kimura K, Makino S, Sano M, Kudo A, Fukuda K. Wnt2 accelerates cardiac myocyte differentiation from ES-cell derived mesodermal cells via non-canonical pathway. *J Mol Cell Cardiol*. 2012 Mar;52(3):650-9.
5. Maekawa Y, Kawamura A, Furuta A, Yuasa S, Fukuda K. A case of severe aortic stenosis with severe coronary artery disease that was successfully treated by balloon aortic valvuloplasty and percutaneous coronary intervention. *Heart Vessels*. 2011 Nov 11.
6. Egashira T, Yuasa S, Fukuda K. Induced pluripotent stem cells in cardiovascular medicine. *Stem Cells Int*. 2011;2011:348960. Epub 2011 Oct 2.
7. Seki T, Yuasa S, Fukuda K. Derivation of induced pluripotent stem cells from human peripheral circulating T cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2011 Sep;Chapter 4:Unit4A.3.
8. Numasawa Y, Kawamura A, Hashimoto S, Endo A, Yuasa S, Maekawa Y, Kuribayashi S, Fukuda K. Successful percutaneous coil embolization of coronary-pulmonary, -carotid, and -internal mammary artery fistulas. *Heart Vessels*. 2011 Jul 7.
9. Arai T, Kawamura A, Yuasa S, Maekawa Y, Fukuda K. Successful coronary intervention of chronic total occlusion of the right coronary artery by ipsilateral injection via an isolated conus artery. *Heart Vessels*. 2011 Jul 2.
10. Maekawa Y, Kawamura A, Yuasa S, Ohno Y, Arai T, Numasawa Y, Endo A, Fukuda K. Outcomes of Intravascular Ultrasound-Guided Percutaneous Coronary Intervention With Drug-Eluting St

ents Versus Bare Metal Stents for Acute Coronary Syndrome in Octogenarians. *Angiology*. 2011 Apr 20.

11. Hara M, Yuasa S, Shimoji K, Onizuka T, Haya shiji N, Ohno Y, Arai T, Hattori F, Kaneda R, Kimura K, Makino S, Sano M, Fukuda K. G-CSF influences mouse skeletal muscle development and regeneration by stimulating myoblast proliferation. *J Exp Med*. 2011 Apr 11;208(4):715-27. Hara and Yuasa are equally contributed.

## 2. 学会発表 (2011年度)

1. Yuasa S: Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. Kuopio Stem cell Workshop, Kuopio, Finland, September 28, 2011
2. Yuasa S: Generation of induced pluripotent stem cells from human peripheral blood: less invasive and clinically applicable technique. The 41th Taiwan Society of Cardiology (TSOC) Annual Convention and Scientific Session. Taipei, Taiwan. May 14, 2011
3. Yuasa S: The establishment of analysis methods and novel therapies for cardiovascular diseases syndrome using human iPS cells. The Japanese Circulation Society. Symposium. Fukuoka. Mar 17, 2012.
4. Yuasa S: The establishment of analysis methods for cardiovascular genetic diseases using human iPS cells. Symposium. 第85回日本薬理学会年会. 京都. 2012年3月15日
5. Yuasa S: Drug evaluation for personalized medicine by using human iPS cells. The 28th Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese Section. Symposium. Tokyo. December 2, 2011
6. 湯浅慎介: 末梢血最終分化 T 細胞からの iPS 細胞樹立方法の開発、日本臨床免疫学会総会 モーニング教育講演. 東京. Sep 7, 2011
7. Yuasa S: Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Peripheral Blood: Less Invasive and Clinically Applicable Technique. The Japanese Circulation Society. Symposium. Yokohama. August 4, 2011.
8. 湯浅 慎介: iPS 細胞時代に向けた心筋再生の現状と展望. 日本動物細胞工学会 2011 年度大会. 東京. 2011 年 7 月 22 日

## G. 知的所有権の取得状況

特になし

## 別紙 4

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
湯浅慎介	臨床応用へ向けたiPS細胞樹立方法の開発	呼吸と循環	Vol. 60, No. 5	459-463	2012年
湯浅慎介	AHA2011学会聴講記	International Review of Thrombosis	Vol. 7, No. 1	74-76	2012年
湯浅慎介	患者特異的iPS細胞による疾患メカニズムの解明	Annual Review of Circulation		49-53	2012年
湯浅慎介、福田恵一	炎症細胞が作り出すニッチと筋肉再生	実験医学増刊号	Vol. 29 No. 10	198-203	2011年

特集

iPS細胞を用いた心臓病の診断と治療

## 臨床応用へ向けた iPS細胞樹立方法の開発\*

湯浅 慎介<sup>1,2</sup>

### はじめに

2006年に人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell; iPS cell)の樹立が初めて報告された<sup>1)</sup>。最初の報告はマウスを用いたものであり、ヒトiPS細胞の樹立が可能となるまでにはかなりの時間が必要なのではないかと考えられていた。しかしながら、翌2007年にはヒトiPS細胞の樹立が報告され<sup>2)</sup>、間もなく世界中で爆発的にヒトiPS細胞研究が進み始めた。iPS細胞が発明されるまでは、再生医療を目的とした幹細胞利用という点では胚性幹(embryonic stem; ES)細胞や様々な成体幹細胞があった<sup>3)</sup>。成体幹細胞は大人の体内にある幹細胞であり、再生医療目的に用いる際には自分の体から採取可能であり倫理的問題が少ない。しかしながら、成体幹細胞は存在する細胞数が少ないこと、増殖能が低いこと、分化能が限られていることなどにより思うように臨床応用が進んでいなかった。一方でES細胞は、増殖能や多分化能は非常に優れているが、ヒトES細胞を採取するにはヒトの初期胚を使う必要があることなどによる倫理的問題に加えて、移植した際には免疫学的拒絶という大きな問題がつきまっていた。しかしながら、ES細胞が持つ多くの可

能性から、心筋細胞分化などの基礎研究が着実に進んでいた<sup>4,5)</sup>。また、幹細胞としての能力はiPS細胞はES細胞とほぼ同様とされているために、これらのES細胞を用いた研究の知見はiPS細胞研究に応用可能である。

当初のiPS細胞研究の世界的な流れは、基礎的なiPS細胞の解析や新規樹立方法の開発に重点が置かれていた。現在iPS細胞の臨床応用として最も期待されているものは、再生医療への応用である<sup>6)</sup>。様々な疾患によって臓器障害に陥った際には、各臓器で機能細胞が減ってくるのが知られている。そのような傷害された臓器に対してiPS細胞由来の元気な分化成熟細胞を移植することにより再生医療を開発しようとする試みがなされている。現在のヒトiPS細胞を用いた再生医療開発の取り組みとしては、効果的な細胞移植医療の開発と移植細胞の長期的な安全性の検証などが活発に試みられている。すなわち、通常の薬剤開発と同様に安全性と効果を確認している段階である。

一方で、遺伝性疾患の病態解明と新規治療方法の開発に向けた、疾患モデル作製としてのiPS細胞研究は既に広く使われ始めている。すなわち、遺伝性疾患の患者に皮膚生検を行うことにより得られた皮膚組織より線維芽細胞の樹立を行い、

\* The Development of iPS Cell Generation Methods for Clinical Application

<sup>1</sup> 慶應義塾大学医学部循環器内科(〒160-8582 東京都新宿区信濃町35) Shinsuke Yuasa: Department of Cardiology, Keio University School of Medicine

<sup>2</sup> 同 総合医科学研究センター Center for Integrated Medical Research, Keio University School of Medicine



iPS細胞樹立に向けてリプログラミング因子の遺伝子導入を行うことでiPS細胞樹立を行う。このようにして樹立されたiPS細胞は患者のゲノムにコードされた全ての遺伝情報を受け継いでいるために、遺伝性疾患の原因遺伝子も受け継いでいる。このiPS細胞を用いることにより、心筋症などの患者からiPS細胞を樹立し心筋細胞を分化誘導することにより、病気のヒト心筋細胞が*in vitro*で容易に作れるようになる。さらに、この病気のヒト心筋細胞を分子生物学的、生理学的に解析することにより、未解決だった病気の原因解明や、同細胞を用いたドラッグスクリーニングなどにより新規治療方法の開発ができるのではないかと考えられ、活発に研究が行われている。

### 臨床応用へ向けた 新規 iPS 細胞樹立方法の確立の必要性

このように様々な可能性を有するiPS細胞であるが、実際に臨床応用を念頭に研究を始めると、問題点が幾つか残されていることに気が付く。その一つは、ヒトiPS細胞樹立方法として最初に開発された方法であり、現在世界中で最も一般的となっている方法であるが、iPS細胞を樹立する際に皮膚生検から線維芽細胞を樹立することである。当初、われわれは皮膚生検をすることに抵抗を覚え、実際に広く臨床に応用していくためには皮膚生検を含む問題点を解決する必要があるということを考えさせられた。

ヒトiPS細胞の一般的な作り方を概説する。①皮膚生検を行い、同組織から線維芽細胞を樹立する。②線維芽細胞に対して、レトロウイルスを初めとした遺伝子の運び屋を用いてOct3/4, Sox2, Klf4, c-Mycという山中教授が発見した幹細胞リプログラミング因子の遺伝子導入を行う。③ヒトES細胞の生存の条件(feeder細胞上でbFGFなどを含む培地)で、培養を続ける。④皮膚生検をしてから約2カ月で最初のiPS細胞コロニーが出現し、同単一コロニーを分離し増やして用いる。非常に再現性が高い方法であり世界中の標準的な方法となりつつあるものである。ここでわれわれが考えた解決すべき問題点を上記の順番に沿って説明していく。

#### 1. 皮膚生検

皮膚生検は一般的に手術などに比べると極めて侵襲性が低いものであるとされている。消毒、麻酔、生検、縫糸、感染予防、抜糸が順次行われていく。皮膚生検といえども手術に準じたものであり、患者の痛み、僅かながらのリスクそして傷跡の問題などがある。特に子供や女性では痛みや傷跡の問題は避けなければならないものであると考えられる。再生医療や疾患解析などのいかなる目的であっても、iPS細胞を広く臨床応用するためには侵襲性が低く採取できる患者検体からiPS細胞を樹立する方法を開発する必要があると考えられる。

#### 2. 遺伝子の運び屋

iPS細胞を作るためには元の細胞(線維芽細胞など)に対して遺伝子導入を行う必要がある。最も一般的な遺伝子導入方法としてレトロウイルスを用いる方法がある。レトロウイルスは宿主細胞に感染し、ゲノムへ挿入をし外来遺伝子を安定発現することが知られている。その安定した外来遺伝子の発現調節から、様々な基礎研究で非常に有益なツールとなっており、また一部の臨床研究でも使われてきた。しかしながら、外来遺伝子がゲノムへ挿入されてしまうこと自体に臨床応用へ向けては不安が残る材料となってしまう。iPS細胞を作るために用いる遺伝子の一部にはoncogeneとして知られているものを用い、将来的に移植する可能性がある細胞のゲノムへ挿入されることは気が進まない。また、oncogeneなどのように有害であることが知られていない遺伝子であったとしても、ゲノムへ挿入されること自体が、内在性の遺伝子発現調節を狂わせる可能性もあり、再生医療による移植後の長期的な安全性を担保するためには避けるべきであろう。すなわち、遺伝子がゲノムへ挿入される方法は回避するべきであると考えられる。

#### 3. iPS細胞培養条件

ヒトiPS細胞の培養条件はヒトES細胞の培養条件と同様であり、ヒトiPS細胞を維持するためにはfeeder細胞が必要である。feeder細胞は、一部の細胞株やMEF(マウス胎仔線維芽細胞)を用いる。いくつかの報告では、feeder細胞の代

替条件があるが、代替条件の多くは培養にかかる費用が顕著に高くなる。現実的に誰でも気楽に用いるためには技術革新が望まれる分野である。

#### 4. 樹立にかかる期間

ヒト iPS 細胞を作るには皮膚生検から約 2 カ月を要す。実際そのうち数週間を線維芽細胞の樹立に充てて、残りの期間で遺伝子導入から、iPS 細胞樹立を行っている。2 カ月という期間は決して短い期間とは言えず、短縮していく必要がある。

ヒト iPS 細胞は可能性を多く含むものであるが、当初に開発された方法は、実臨床で日常的に、容易に行えるものではない。無限の可能性のある iPS 細胞を、より広い目的で使用するために、より非侵襲的で簡便な iPS 細胞樹立方法を開発する必要があると考えた。

#### 非侵襲的な iPS 細胞樹立方法の開発に向けて

われわれは、まず非侵襲的に採取できる組織を探索することとした。様々な細胞が iPS 細胞になり得ることが報告されていたが、その多くの細胞が決して非侵襲的に採取できるという細胞ではなかった。そのなかで非侵襲的な組織として、毛包に存在するケラチノサイトから iPS 細胞が樹立できることも報告されていた。われわれは、これらの報告を含めて様々な細胞種でヒト iPS 細胞を樹立しようと試みたが、非侵襲的に採取できる細胞種からの iPS 細胞樹立は困難であった。次に、われわれはヒトの末梢血に着目した。末梢血は日常的に血液検査で得ることが可能であり、最も侵襲性が少なく患者検体を得る方法の一つであると考えられる。iPS 細胞を樹立するために用いる細胞としては、ある程度増殖能を有する必要がある。また、様々な基礎的な検討の結果、ヒト末梢血中に存在する T リンパ球に着目することとした。末梢血中の最終分化 T 細胞は抗 CD3 抗体、インターロイキン 2 (IL2) の存在下で容易に活性化し、増殖させることが可能であることが知られていた。

次にわれわれは遺伝子の運び屋として、様々な方法を検討した。当初は最も一般的な方法としてレンチウイルスとレトロウイルスを用いる方法を検討していた。しかしながら、これらのウイルス

はゲノムへ挿入するために、ゲノムを傷つけてしまい、長期的安全性が担保されない。そこでわれわれは別の運び屋としてセンダイウイルスを用いることとした。センダイウイルスは(-)鎖 RNA ウイルスであり、感染効率が比較的高く、ゲノムへの挿入がないウイルスとして知られている。

#### ヒト末梢血からの iPS 細胞樹立方法の開発<sup>7)</sup>

当初の検討からヒト末梢血 T 細胞は従来の iPS 樹立法で用いるレトロウイルスでは感染効率も不十分であり、iPS 細胞樹立が困難であった。そこでわれわれは、センダイウイルスと末梢血から得られる活性化 T 細胞を組み合わせることにした。その結果、活性化 T 細胞に対して green fluorescent protein (GFP) を運ぶセンダイウイルスは極めて高効率で感染することが確認された。続いて iPS 細胞を作るためのリプログラミング因子を運ぶセンダイウイルスを活性化 T 細胞へ感染させると約数週間でヒト ES 細胞様コロニー、すなわち T 細胞由来 iPS 細胞が出現してくることが観察された(図 1)。さらにこの方法で樹立された iPS 細胞では qRT-PCR 法によって、細胞内にセンダイウイルス由来の導入因子の残存がないことが確認された。

われわれが樹立した末梢血 T 細胞由来 iPS 細胞は ES 細胞、従来の線維芽細胞由来 iPS 細胞と同様に未分化マーカーの発現が認められた。また、奇形腫形成能および、*in vitro* (培養皿上)での三胚葉由来組織へ分化することを免疫染色にて確認し、末梢血 T 細胞由来 iPS 細胞の多分化能を確認した。

また、末梢血 T 細胞由来 iPS 細胞が本当に T 細胞由来であることの検討をした。末梢血中に存在する T 細胞は最終分化 T 細胞であり、抗原認識をして免疫を担当している細胞である。すなわち、成熟 T 細胞の細胞膜上に存在する T 細胞受容体により様々な抗原を認識して、各種免疫反応を来している。個々の T 細胞は様々な抗原に対応するように、B 細胞の抗体産生と同様に T 細胞受容体がゲノムレベルで再構成をして、その多様性を獲得している。すなわち、発生・分化に伴いゲノムでの T 細胞受容体の遺伝子内に再構成

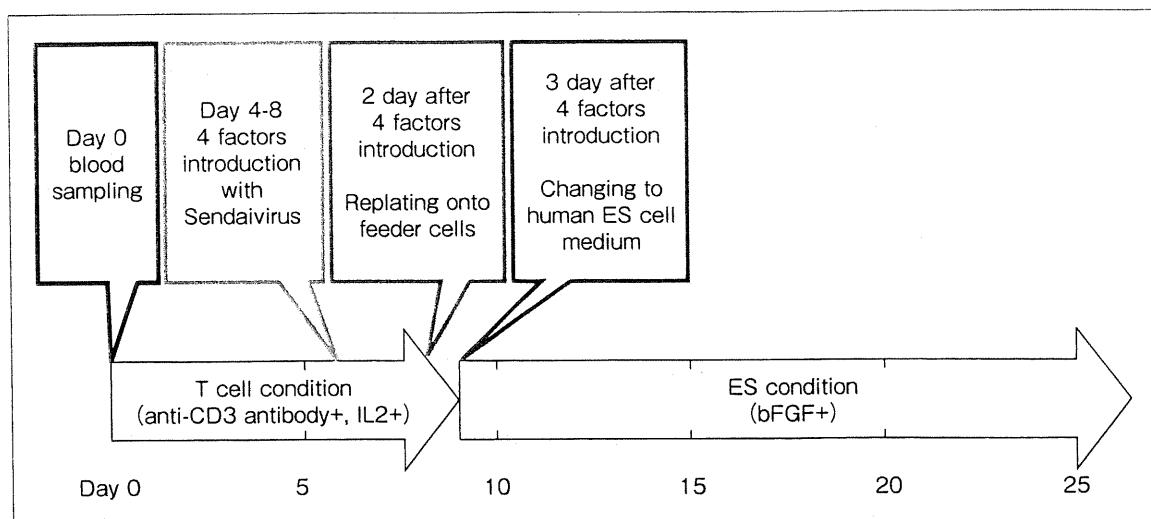


図1 ヒト末梢血採取からiPS細胞作製までの時間経過

が行われ胸腺で教育されることにより、その結果一つのT細胞あたり、ある特定の抗原に反応する一つのT細胞受容体が発現するようになる。T細胞受容体の再構成の有無はT細胞由来iPS細胞のゲノムを調べることで判明する。T細胞受容体遺伝子のゲノムでの再構成が行われていた場合には、そのiPS細胞は成熟T細胞由来であると言える。しかしながら、T細胞受容体の再構成が認められなければ、T細胞由来ではないということが分かる。われわれはT細胞由来iPS細胞におけるT細胞受容体のゲノム再構成を調べた結果、全てのT細胞由来iPS細胞においてT細胞受容体のゲノム再構成が認められ、T細胞由来iPS細胞がT細胞由来であることが確認された。また、将来的にiPS細胞由来成熟細胞を用いて細胞移植を行う際に、移植細胞が腫瘍などを形成した際の判別として、レシピエントの細胞と区別できるようにする必要がある。従来のレトロウイルスを用いたiPS細胞の樹立方法ではゲノムへの遺伝子挿入がこの役割を果たすと考えられるが、逆にゲノムへの遺伝子挿入自体が癌化リスクとなることが危惧されるため、現実的ではない。また、動物実験ではGFPなどの蛍光蛋白を移植前に遺伝子導入しておいて、移植後に観察する方法がよくとられる。しかしながら、遺伝子導入そのものが好ましくないのは前述のとおりであり、ヒトへの応用の際には用いることができない。しかしわれわれの方法では、成熟T細胞は

分化の過程でT細胞受容体領域に遺伝子再構成が起きるため、これを用いてiPS細胞由来の移植細胞をレシピエントの細胞から区別することが可能である。実際にわれわれは、T細胞由来iPS細胞を免疫不全マウスに移植し奇形腫を形成し、数カ月後に採取してゲノムの再構成を検討した。その結果、奇形腫のゲノムにおいて、元のT細胞由来iPS細胞と同様のパターンの、T細胞受容体領域にモノクローナルな遺伝子再構成を認めることを明らかにした。また、従来の方法で線維芽細胞の遊出に1カ月ほどの期間を要したが、T細胞の活性化は数日で可能であるため、この期間を狭めることにより、ヒトiPS細胞の樹立にかかる期間を大幅に短縮することに成功した。

#### おわりに

われわれは、センダイウイルスと末梢血から得られる活性化T細胞を組み合わせることで、ごく少量の血液サンプルからも、ゲノムに外来遺伝子が挿入されずにヒトiPS細胞を効率的に樹立する方法を開発した<sup>8)</sup>。非侵襲的な簡便・迅速・高効率なiPS細胞樹立方法を開発することにより、様々な目的での臨床応用を強く推進できると考えている。

#### 文献

- 1) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast

- cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676, 2006
- 2) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861-872, 2007
  - 3) Fukuda K, Yuasa S: Stem cells as a source of regenerative cardiomyocytes. *Circ Res* 98:1002-1013, 2006
  - 4) Yuasa S, Itabashi Y, Koshimizu U, et al: Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat Biotech* 23:607-611, 2005
  - 5) Shimoji K, Yuasa S, Onizuka T, et al: G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes *in vivo* and in derivation from ESCs and iPSCs. *Cell Stem Cell* 6:227-237, 2010
  - 6) Yuasa S, Fukuda K: Recent advances in cardiovascular regenerative medicine: the induced pluripotent stem cell era. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 6:803-810, 2008
  - 7) Seki T, Yuasa S, Oda M, et al: Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell* 7:11-14, 2010
  - 8) Seki T, Yuasa S, Fukuda K: Unit 4A.3 Derivation of induced pluripotent stem cells from human peripheral circulating T cells. In: *Current Protocols in Stem Cell Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2011

## 学会聴講記

# AHA Scientific Sessions 2011

湯浅慎介 Shinsuke Yuasa

慶應義塾大学医学部 循環器内科・総合医科学研究センター

2011年11月にアメリカ合衆国フロリダ州オーランドにて開催された米国心臓協会年次集会に参加してきた。同学会は米国の異なった場所で毎年開催され、循環器の臨床・研究における世界で最も大きな学会である。同学会においては世界中より多くの臨床医ならびに研究者が集まり、大規模臨床試験の最新結果や、個々の最新の研究結果などが発表され、それらの結果を聞くことは循環器内科医にとって最大の関心事である。



写真1 学会場正面玄関

(→ p.7 カラーグラフィック PHOTO 9参照)

米国心臓協会 (AHA, American Heart Association) 年次集会は、最近10年間はオーランド、シカゴ、ダラス、ニューオーリンズで順繰りに開催されている。2011年のAHA年次集会は、米国南東部に位置するフロリダ州オーランドにて開催された。オーランドは日本からの直行便がなく、ダラスやシカゴなどでの乗り継ぎを経て約18時間かかる遠方であるが、温暖な気候とウォルト・ディズニー・リゾートやユニバーサル・スタジオといったアミューズメントパークも多数あり、数ある学会場の中でも人気のある場所である。年次集会は、オーランド国際空港から西に約20 km離れた場所にあるOrange County Convention Centerにて11月12日～16日まで開催された。ちなみに同会場はディズニー・リゾートがある地域まで約15 kmである。

### 学会の全体的な印象

米国心臓協会年次集会は、冒頭でも述べたように世界で最も大きい循環器領域の学会として知られている。年によって異なるが、総参加人数が30,000人

以上に及ぶこともあり、演題採択率が20%を切る年もあることが知られている。

しかしながら、近年は米国の不況の影響もあり、学会場自体の雰囲気も以前のような華やかさが陰ってきていることが実感されていた。実際に参加人数も年々減ってきており、本年は総参加人数20,000人弱、演題採択率50%弱であった。総発表数がそれほど変わっていないことを考えると、純粹に演題応募が半数以下に減っていると考えられる。

米国医療業界は不況で苦しんでおり、同様に米国の研究者も研究費の獲得に苦しんでいるという話も聞くことから、米国の臨床医および研究者の参加人数自体も減ってきていることが想定される。その一方で、参加人数減少による学会収益の減少や、医療業界の景気悪化による寄付の減少などによるものと考えられるが、米国心臓協会自体も不況に苦しんでいるようである。

年次集会の参加費が年々上昇しており、演題応募に際して課金されるようになり、また以前は演題が採択された参加者には参加費が免除されていたが、現



写真2 学会場メインホール

(→ p.7 **カラーグラフィック** PHOTO 10参照)



写真3 学会場の西コンコース前

(→ p.7 **カラーグラフィック** PHOTO 11参照)

在は演題採択者にも参加費が徴収されるようになって  
いる。参加費も日本の学会参加費に比べるとかなり高  
額であり、お金を払うに値する、より魅力あるものにし  
て欲しいものである。

一方で近年は欧州の好景気に押されて欧州心臓  
学会議(ESC, European Society of Cardiology)に人  
気が集まっており、総参加者も米国心臓協会年次集  
会を上回るようになったが、これも2012年度にはどう  
なることか分からない。欧州心臓学会議は米国心臓  
協会年次集會に比べると臨床寄りの学会で、基礎研  
究に割く時間や場所が少なく、多少趣の異なる学会  
であると言える。

### 大規模臨床試験から

注目の臨床試験としては、メイン会場で発表される数々  
のLate-Breaking Clinical Trialsであろう。特に日本で  
はまだ使用できない新規薬剤の効果と安全性を大規  
模臨床試験で検証している最先端の欧米型医療の  
創出は、日本で一般診療に従事していると接する機  
会がないため、非常に興味深いものである。以下に  
そのいくつかを紹介する。

abciximabは抗血小板薬として開発された血小板  
の糖蛋白GP IIb/IIIaの拮抗薬として働くモノクローナ  
ル抗体である。本薬剤をST上昇型心筋梗塞に対し





て標準的治療とPCIを施行する際に、冠動脈注射を静脈注射と比較したAIDA STEMI試験が発表された。その結果は、安全ではあるが優位性も示されなかったという発表であった。

また、PCIを施行する非ST上昇型心筋梗塞に対して、abciximabに加えて未分画ヘパリンもしくは直接的トロンビン阻害薬であるbivalirudinの併用による効果を比較したISAR-REACT 4試験が発表された。結果は30日の追跡期間の中で効果には差がないが、出血においてabciximabに加えて未分画ヘパリンを使用した群においてリスクを増大させた。

急性冠症候群において、標準治療としてaspirinとclopidogrel服用下での、新規経口プロテアーゼ活性化受容体1拮抗薬であるvorapaxar追加による効果と安全性を検証したTRACER試験が発表された。追跡期間2年間において、効果に差は認めなかったものの、vorapaxar追加により出血頻度が増すことが示された。また急性冠症候群において、従来の治療法に加えて直接的第Xa因子阻害薬であるrivaroxabanを低容量で追加投与することによる効果と安全性を検証するATLAS ACS 2-TIMI 51が発表された。その結果は、いくつかのエンドポイントでは優位性を示したが、出血のリスクはやはり増すという結果であった。

これらの新規薬剤を用いた大規模臨床試験の結果は、未来の標準治療を決めるものであり、欧米の学会の醍醐味ともいえるものであろう。しかしながら実際には、これらの試験の多くは発表直後に論文発表されることが多く、あえて会場に足を運んで聞く必要

性があるか否かに多少の疑問も残る。また日本においては、新規薬剤の導入にかなり時間がかかるため、たとえ最新の知見を入手しても、日本における実際の医療に応用されるまでの間に新規薬剤の効果や安全性に関する新たな臨床試験の結果が出ることで二転三転してしまうようなことがよくある。

また欧米の薬剤を早期に導入することに関しては賛否両論であり、効果や安全性は多数の臨床試験を経てからでなければわからないということがはっきりしており、また効果が確かでもないのに関わらず欧米の製薬会社の新薬を導入すると、日本の医療費の多くが欧米に流れるようになる。これらのことを考えると、早期に導入し過ぎるよりも、安全性と効果がよりはっきりしてから導入する方が全体としての恩恵は多いのかもしれない。

## おわりに

世界的な不況もあり、やや暗い雰囲気のある学会であったため、全体的に否定的な見解を述べてしまったが、現在の我々の置かれている立場を知り、世界の趨勢を知る上で、世界に出ることは必須であり、学会に参加し世界と交流していくことが必要であることは間違いない。今後も米国が世界の中心であり続けることは間違いなく、学ぶ点は多々あるが、まず日本の科学を着実に進歩させるとともに、今後の新興国である中国、インドやブラジル等の今後の動向にも注視していきたい。

### 3. 患者特異的 iPS 細胞による疾患メカニズムの解明

慶應義塾大学医学部循環器内科・総合医科学研究センター講師 湯浅慎介

**key words** iPS cell, cardiomyocyte, long QT syndrome, hypertrophic cardiomyopathy, personalized medicine, human peripheral blood derived iPS cells

#### 動 向

2006年に人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS cell) の樹立が初めて報告された<sup>1)</sup>。最初の報告はマウスを用いたものであり、ヒト iPS 細胞ができるようになるまではもう少し時間がかかるのではないかと考えられていた。しかしながら翌2007年にはヒト iPS 細胞の樹立が報告され<sup>2)</sup>、間もなく世界中で爆発的に iPS 細胞研究が進み始めた。当初の世界的な研究の流れは、基礎的な iPS 細胞の解析や新規樹立方法の開発に重点が置かれていた<sup>3)</sup>。iPS 細胞の臨床応用として最も期待されているものは、再生医療への応用である。様々な疾患によって臓器障害に陥った際には、各臓器で機能細胞が減ってくる事が知られている。そのような傷害された臓器に対して iPS 細胞由来の元気な分化細胞を移植することにより再生医療を開発しようと試みられている。現在のヒト iPS 細胞を用いた再生医療開発の取り組みとしては、長期的な安全性の検証と効果的な細胞移植医療の開発が活発に試みられている。

一方で、遺伝性疾患の病態解明と新規治療方法の開発に向けた疾患モデル作製としての iPS 細胞研究が行われ始めている。すなわち遺伝性疾患の

患者さんより皮膚生検を行うことにより得られた皮膚組織より線維芽細胞の樹立を行い、遺伝子導入を行うことで iPS 細胞樹立を行う。このようにして樹立された iPS 細胞は患者さんのゲノムにコードされた全ての遺伝情報を受け継いでいるために、遺伝性疾患の原因遺伝子も受け継いでいる。例えば心筋症などの患者さんから iPS 細胞を樹立し心筋細胞を分化誘導することにより、病気のヒト心筋細胞が *in vitro* で容易に作れるようになる。この病気のヒト心筋細胞を解析することにより、未解決だった病気の原因解明や、同細胞を用いたドラッグスクリーニングなどで新規治療方法の開発ができるのではないかと考えられる。

#### A. ヒト末梢血より iPS 細胞樹立方法の確立

このように様々な可能性を有する iPS 細胞であるが、実際に臨床応用を念頭に研究を始めると、問題点が幾つか残されていることに気づく。その一つは iPS 細胞を樹立する上で皮膚生検から線維芽細胞を樹立する必要があることである。皮膚生検は、消毒、麻酔、生検、縫糸、感染予防、抜糸が順次行われていく。皮膚生検といえども手術に

準じたものであり、患者さんの痛み、僅かながらのリスクそして傷跡の問題がある。特に子供や女性では痛みや傷跡の問題は避けなければならないものである。iPS細胞を臨床応用するためには侵襲性の低い患者献体からiPS細胞を樹立する方法を開発する必要があると考えた。末梢血は日常的に血液検査で得ることが可能であり、最も侵襲性が少なく患者献体を得る方法の一つである。様々な検討の結果、ヒト末梢血中に存在する最終分化Tリンパ球からiPS細胞が効率的に樹立しうることを見出した。特に我々は、センダイウイルスという遺伝子の運び屋と末梢血から得られる活性化T細胞を組み合わせるにより、ごく少量の血液サンプルからも、ゲノムに外来遺伝子が挿入されずにヒトiPS細胞が効率的に樹立可能であることを見出した<sup>4)</sup>。非侵襲的な簡便・迅速・高効率なiPS細胞樹立方法を開発することにより、臨床応用を強く推進できると考えている。

## B. 循環器疾患特異的iPS細胞の開発

前述したように患者由来iPS細胞は患者のゲノムにコードされた全遺伝情報を有しているために、現在治療法がない遺伝性疾患などの病態解明と新規治療方法の開発という観点から、循環器領域においても疾患iPS細胞研究が進んでいる。さらに、現在は同モデルを用いた薬剤スクリーニング系の開発と新規薬剤候補が提示されてきており、実臨床に役立つ研究に近づいてきていることが実感される。本稿では、最近一流紙に相次いで報告された遺伝性QT延長症候群にまつわる3報と肥大型心筋症の表現形を伴うLEOPARD症候群に関する解析について概説する。

## C. 遺伝性QT延長症候群特異的iPS細胞

遺伝性QT延長症候群に関しては、昨年10

月から今年の3月にかけて一流紙に相次いで報告された。それらはQT延長症候群のtype1, 2, 8に関して、それぞれiPS細胞の作製とiPS細胞由来心筋細胞の機能解析を行っている。遺伝性QT延長症候群の多くは、単一遺伝子変異による疾患であり細胞膜にあるイオンチャネルの異常により生じる。QT延長症候群は心臓突然死の多くの原因、特に若年突然死の多くの原因になっているといわれているが、根本的な治療方法はないのが現状である。現実には、ある程度の効果が期待される薬物療法と植込み型除細動器を組み合わせるようになる。QT延長症候群の詳細な分子生物学的・電気生理学的な解析と根治薬の開発を目指して、QT延長症候群モデルの作製と薬剤スクリーニングが活発に成されている。

最初の報告はドイツのグループからのものである<sup>5)</sup>。カリウムチャネル遺伝子変異(KCNQ1 R190Q)を認める8歳の少年からLQT type1特異的iPS細胞を樹立している。同iPS細胞から心筋細胞を分化誘導し、電気的な活動を記録するとカリウム電流の著明な低下が観察され、イソプロテレノールを用いると活動電位持続時間が延長した。また、臨床的にLQT type1の治療目的で用いられる薬剤であるβブロッカーの投与で不整脈の出現が抑制されている。本報告における遺伝子変異の機能解析などは過去に報告されているものであり、臨床象を含めて患者由来iPS細胞で再現されたという報告である。新規性は低いようにも思えるかもしれないが、世界で初めてのQT延長症候群由来iPS細胞の機能解析である。

続いては、イスラエルのグループからのものである<sup>6)</sup>。前述とは別のカリウムチャネルの遺伝子変異(KCNH2 A614V)を認める28歳の女性からLQT type2特異的iPS細胞を樹立している。本変異に関しても、過去の報告でカリウムチャネルの異常によりカリウム電流の低下をきたすことがわかっている。iPS細胞由来心筋細胞から電氣的

な活動を記録するとカリウム電流の著明な低下が観察され、心電図上のQT延長に相当する電気的な変化も認められた。続いて活動電位持続時間の短縮や不整脈の出現を抑制できる薬剤スクリーニングを行った。カルシウムの細胞内流入が活動電位持続時間や不整脈の出現に関与していることからカルシウムチャネル阻害薬であるニフェジピンを投与したところ、iPS細胞由来心筋細胞において治療効果が確認された。またカリウムチャネル開口薬であるピナシジルを投与したところ、同様にiPS細胞由来心筋細胞において治療効果が確認された。本報告はLQT type2患者からiPS細胞を樹立し、疾患モデルを作製し薬剤スクリーニングが可能であることを示唆した報告である。

次の報告は、アメリカのグループからのものである<sup>7)</sup>。本研究においては、カルシウムチャネル遺伝子変異(CACNA1C G406R)を認める2症例からTimothy症候群(LQT type8)特異的iPS細胞を樹立している。本変異は電位依存性のカルシウムチャネルの不活性化障害をきたすことが知られているが、どのようにQT延長症候群や不整脈をきたすかなどは不明であった。iPS細胞由来心筋細胞から電気的な活動記録をすると、不規則な心筋細胞収縮、過剰なカルシウムの細胞内流入、活動電位持続時間の延長などが確認された。またロスコピチンという薬剤がカルシウムチャネルの電位依存性不活性化を増強させることが知られており、ロスコピチンをiPS細胞由来心筋細胞に添加したところ不規則な心筋細胞収縮、過剰なカルシウムの細胞内流入、活動電位持続時間の延長などが改善されることが確認された。同薬剤を、そのまま患者に用いることは難しいと考えられるが、似た作用を有する薬剤の開発などが有益であることが示唆された。

#### D. 心筋症特異的iPS細胞の作製と解析

LEOPARD症候群は常染色体優性遺伝とされているが、孤発例が多い稀な疾患である。LEOPARD症候群という名前の由来は、その疾患の特徴である全身の黒子(ほくろ)が豹(レパード)に似ていることより命名された症候群である。黒子は生下時から多発し思春期までに次第に増加し、全身皮膚に生じる。本症候群は多発性黒子、心伝導障害、眼間開離、肺動脈狭窄、外陰部異常、精神遅滞、感音性難聴などを特徴とし、このうち心病変が最も生命予後に影響を与えるといわれている。また、LEOPARD症候群の90%程度に原因遺伝子とされるPTPN11遺伝子異常が認められる。PTPN11遺伝子はSHP2という脱リン酸化酵素をコードしている。増殖因子やサイトカインは、細胞膜上の受容体に結合することにより、細胞に情報を伝達して恒常性を維持している。SHP2は様々な増殖因子やサイトカインの細胞内シグナル伝達において重要な役割を担っており、Ras-MAPキナーゼ経路を正に制御している。すなわちPTPN11遺伝子の異常というのはSHP2という脱リン酸化酵素の機能異常を引き起こし、その結果として増殖因子やサイトカインなどの間違った情報が細胞内に伝わり、細胞の増殖、生存や分化などの様々な生命現象に異常をきたし、その結果として病気を発症する。

本研究における患者においてもPTPN11遺伝子異常を認めている典型的LEOPARD症候群である<sup>8)</sup>。LEOPARD症候群の80%は肥大型心筋症を呈することが知られており、最も生命を脅かす病態である。このことよりLEOPARD症候群で、なぜ肥大型心筋症を呈するかを解明すること、そして肥大型心筋症の発症を止める治療方法を研究・開発することが最も必要なことであることがわかる。そのためには、まずLEOPARD症候群iPS細胞由来心筋細胞が、試験管内で肥大するかどうか

を検証する必要がある。LEOPARD症候群iPS細胞由来心筋細胞を健常人と比較した結果、LEOPARD症候群において肥大していくことが判明した。LEOPARD症候群においては脱リン酸化酵素であるSHP2に異常をきたしている。どのタンパクにおいてリン酸化の程度が変化しているかを、リン酸化プロテオミックマイクロアレイにより網羅的検索を行った。同解析は600種類の抗リン酸化タンパク抗体などを用いてリン酸化の影響を検討することができる手法である。LEOPARD症候群と健常人を比較検討することにより、様々なタンパク量（リン酸化タンパクではなく、一つのタンパク全体の量）そのものが、LEOPARD症候群において増えているものと、減っているものがあることが判明した。またリン酸化タンパクに関しても、増えているものと減っているものが多数存在することが判明した。またLEOPARD症候群においてはRas-MAPキナーゼ経路という細胞内タンパクのリン酸化を調節して細胞の増殖、生存や分化などに強く影響を及ぼしているシグナル経路が特に異常をきたしていることが知られている。すなわちLEOPARD症候群においては、増殖因子が細胞に作用した時にこれらの細胞内シグナルの活性化が低下しているといわれている。このことを検証するために、iPS細胞に線維芽細胞増殖因子を作用させRas-MAPキナーゼ系の活性化が健常人とLEOPARD症候群に差があるかを検討した。健常人由来iPS細胞においては線維芽細胞増殖因子を作用後には予想通り速やかにRas-MAPキナーゼ系の活性化が認められている。一方でLEOPARD症候群患者由来iPS細胞に線維芽細胞増殖因子を作用させるとRas-MAPキナーゼ系の活性化反応性が著明に低下していることが判明した。LEOPARD症候群の病気の原因というのはRas-MAPキナーゼ系の活性化の低下であるといわれているが、このことがiPS細胞を用いた研究により試験管の中で再現可能であることが確認

された。

著者らは、これらの実験によりLEOPARD症候群iPS細胞の樹立を確認し、さらにLEOPARD症候群PS細胞由来心筋細胞が肥大をきたすことを示し、LEOPARD症候群iPS細胞においてRas-MAPキナーゼ系の活性化に関するリン酸化の程度に大きな差があることを確認した。以上のことは、これまでに長年蓄積されたLEOPARD症候群の疾患解析の結果と非常によく一致しており、試験管内で再現可能なLEOPARD症候群のモデルを構築したといえよう。今後は、さらに具体的な分子標的を明らかにすることにより、疾患治療方法の開発が進んでいくことと思われる。

## E. 今後の循環器疾患特異的iPS細胞の疾患解析における展望

これらの研究は一見すると似た研究のようにみえるが、これまでの研究とは根本的に違う側面がある。これまでの研究は、患者の遺伝子変異を探索し、発見したとしてもヒトの生きた心筋細胞を用いた解析というのは不可能であった。そのため、これらの変異遺伝子を人工的に培養細胞（ヒト心筋細胞は用いることができないので、他の細胞種）に導入して変異遺伝子の電気生理学的解析や、実験動物（マウスなど）に遺伝子導入をすることによる遺伝子改変動物などを用いて解析することしかなかった。これらの実験系は極めて人工的なものであり、本当にヒトの病気の再現ができているかどうかはわからなかった。そのために疾患解析や治療方法の開発は思うように進んでこなかった。今後は、様々な難治性疾患を対照に患者特異的iPS細胞が作製され、疾患モデル作製の確認と薬剤スクリーニングが行われていくと思われる。一日も早く臨床応用され、患者にフィードバックされていくことが期待される。

## 文献

- 1) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126: 663-76.
- 2) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; 131: 861-72.
- 3) Yuasa S, Fukuda K. Recent advances in cardiovascular regenerative medicine: the induced pluripotent stem cell era. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2008; 6: 803-10.
- 4) Seki T, Yuasa S, Oda M, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell*. 2010; 7: 11-4.
- 5) Moretti A, Bellin M, Welling A, et al. Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med*. 2010; 363: 1397-409.
- 6) Itzhaki I, Maizels L, Huber I, et al. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011; 471: 225-9.
- 7) Yazawa M, Hsueh B, Jia X, et al. Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome. *Nature*. 2011; 471: 230-4.
- 8) Carvajal-Vergara X, Sevilla A, D'Souza SL, et al. Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature*. 2010; 465: 808-12.