

201231064A

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24年度 総括研究報告書

研究代表者 湯浅 慎介

平成25(2013)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24年度 総括研究報告書

研究代表者 湯浅 慎介

平成25（2013）年 5月

目次

I. 総括研究報告	1
ヒトiPS細胞を用いた致死性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	4
III. 研究成果の刊行物・別刷	6

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 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、分化誘導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。同方法を用いて多くの致死的循環器疾患患者から iPS 細胞を樹立し、同 iPS 細胞由来心筋細胞を用いて、疾患解析系を開発する。また同疾患解析系を用いて、疾患表現型の解析、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誘導することで、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。またオーダーメイド医療の実現が望まれている現在、患者特異的 iPS 細胞を用いることにより、個々の患者に合わせた薬効の評価も可能となり、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。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 T 細胞を刺激し、3～5 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を経て 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を証明してきた。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。また長時間記録する際には EAD の出現なども観察され、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。これまでにや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氣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、様々な致死性の循環器疾患を有する患者より、少量末梢血を用いて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培養皿上で再現され、薬効評価などの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、疾患 iPS 細胞を用いたドラッグスクリーニングを行い、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

1. 論文発表 (2012年度)

1. Okata S, Yuasa S, Yamane T, Furukawa T, Fukuda K. The generation of induced pluripotent stem cells from a patient with KCNH2 G603D, without LQT2 disease associated symptom. *J Med Dent Sci.* 2013 ; 60 : 17-22.
2. Numasawa Y, Kawamura A, Kohsaka S, Takahashi M, Endo A, Arai T, Ohno Y, Yuasa S, Maekawa Y, Fukuda K. Anatomical variations affect radial artery spasm and procedural achievement of transradial cardiac catheterization. *Heart Vessels.* 2013 Feb 21.
3. Egashira T, Yuasa S, Fukuda K. Novel insights into disease modeling using induced pluripotent stem cells. *Biol Pharm Bull.* 2013;36(2):182-8.
4. Arai T, Yuasa S, Miyata H, Kawamura A, Maekawa Y, Ishikawa S, Noma S, Inoue S, Sato Y, Kohsaka S, Fukuda K. Incidence of periprocedural myocardial infarction and cardiac biomarker testing after percutaneous coronary intervention in Japan: results from a multicenter registry. *Heart Vessels.* 2012 Dec 29.
5. Tohyama S, Hattori F, Sano M, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Hashimoto H, Suzuki T, Yamashita H, Satoh Y, Egashira T, Seki T, Muraoka N, Yamakawa H, Ohgino Y, Tanaka T, Yoichi M, Yuasa S, Murata M, Suematsu M, Fukuda K. Distinct Metabolic Flow Enables Large-Scale Purification of Mouse and Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Cell Stem Cell.* 12, 1–11, January 3, 2013.
6. Nishiyama T, Kaneda R, Ono T, Tohyama S, Hashimoto H, Endo J, Tsuruta H, Yuasa S, Ieda M, Makino S, Fukuda K. miR-142-3p is essential for hematopoiesis and affects cardiac cell fate in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Sep 7;425(4):755-61.
7. Egashira T, Yuasa S, Suzuki T, Aizawa Y, Yamakawa H, Matsuhashi T, Ohno Y, Tohyama S, Okata S, Seki T, Kuroda Y, Yae K, Hashimoto H, Tanaka T, Hattori F, Sato T, Miyoshi S, Takatsuki S, Murata M, Kurokawa J, Furukawa T, Makita N, Aiba T, Shimizu W, Horie M, Kamiya K, Kodama I, Ogawa S, Fukuda K. Disease characterization using LQTS-specific induced pluripotent stem cells. *Cardiovasc Res.* 2012 Sep 1;95(4):419-29.

2. 学会発表（2012年度）

1. Yuasa S: iPS 細胞を用いた心臓病疾患モデルの構築と病態解明 Symposium. The 12th Congress of the Japanese Society for Regenerative Medicine. Yokohama. Mar 22, 2013.
2. Yuasa S: The Cardiovascular Disease Modeling by using iPS cells. The Japanese Circulation Society. JCS/ISHR joint symposium. Yokohama. Mar 16, 2013.
3. Yuasa S: The cardiovascular Disease modeling by using iPS cells. The 29th Annual Meeting of the International Society for Heart

Research Japanese section. Fukuoka. Symposium. Oct 27, 2012.

4. Yuasa S: Disease modeling using iPS cells. The 60th annual scientific session of the Japanese college of cardiology. Kanazawa. Panel discussion. Sep 16, 2012.

G. 知的所有権の取得状況

特になし

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	iPS細胞を用いた心臓再生医療の現状と未来	血管医学	Vol. 14 No. 1.	71-74	2013年
湯浅慎介	iPS細胞を用いた循環器疾患モデル構築とその応用	週刊医学の歩み		In press	2013年
湯浅慎介	iPS細胞を用いた循環器疾患モデル構築	最新医学	68巻7号	In press	2013年
湯浅慎介	iPS細胞を用いた循環器診療はどこまで進んだか？	CIRCULATION Up-to-Date	Vol.8 No. 2.	76(188)-81(193)	2013年
Okata S, Yuasa S, Yamane T, Furukawa T, Fukuda K.	The generation of induced pluripotent stem cells from a patient with KCNH2 G603D, without LQT2 disease associated symptom.	J Med Dent Sci.	60	17-22	2013年
Numasawa Y, Kawamura A, Kohsaka S, Takahashi M, Endo A, Arai T, Ohno Y, Yuasa S, Maekawa Y, Fukuda K.	Anatomical variations affect radial artery spasm and procedural achievement of transradial cardiac catheterization.	Heart Vessels	2013 Feb 21.	Online	2013年
Egashira T, Yuasa S, Fukuda K.	Novel insights into disease modeling using induced pluripotent stem cells.	Biol Pharm Bull.	36(2)	182-8	2013年
Arai T, Yuasa S, Miyata H, Kawamura A, Maekawa Y, Ishikawa S, Nomura S, Inoue S, Saito Y, Kohsaka S, Fukuda K.	Incidence of periprocedural myocardial infarction and cardiac biomarker testing after percutaneous coronary intervention in Japan: results from a multicenter registry.	Heart Vessels	2012 Dec 29.	Online	2012年

Tohyama S, Hattori F, Sano M, Hisahiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Hashimoto H, Suzuki T, Yamashita H, Satoh Y, Egashira T, Seki T, Murakawa N, Yamakawa H, Ohgino Y, Tanaka T, Yoichi M, Yuasa S, Murata M, Suematsu M, Fukuda K.	Distinct Metabolic Flow Enables Large-Scale Purification of Mouse and Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes.	Cell Stem Cell	12	1-11	2013年
Nishiyama T, Kaneda R, Ono T, Tohyama S, Hashimoto H, Endo J, Tsuruta H, Yuasa S, Iwamoto M, Makino S, Fukuda K.	miR-142-3p is essential for hematopoiesis and affects cardiac cell fate in zebrafish.	Biochem Biophys Res Commun	425(4)	755-61	2012年
Egashira T, Yuasa S, Suzuki T, Aizawa Y, Yamakawa H, Matsuhashi T, Ohno Y, Tohyama S, Okata S, Seki T, Kuroda Y, Yae K, Hashimoto H, Tanaka T, Hattori F, Sato T, Miyoshi S, Takatsuki S, Murata M, Kurokawa J, Furukawa T, Makita N, Aiba T, Shimizu W, Horie M, Kamiya K, Kodama I, Ogawa S, Fukuda K.	Disease characterization using LQTS-specific induced pluripotent stem cells.	Cardiovasc Res	95(4)	419-29	2012年

血管医学

Vascular Biology & Medicine

Vol.14/No.1 2013 3

別刷

 メディカルレビュー社

iPS 細胞を用いた心臓再生医療の現状と未来

慶應義塾大学医学部循環器内科

Shinsuke Yuasa 湯浅慎介

KEY WORDS

- iPS 細胞
- 心筋細胞
- 心不全

ヒト iPS 細胞が初めて報告され 5 年が経過したが、ものすごい速さで基礎研究が進んでいる。ヒト iPS 細胞の応用としては、大きく分けて再生医療と疾患モデルの構築であり、それらを両輪として論文発表も相次いでいる。後者は病態解明と創薬を目的としており、前者は直接的な治療法として考えられている。心臓病に対する再生医療を実現させるためには、心筋細胞分化、心筋細胞純化そして心筋細胞移植方法などのさまざまな基盤技術が必要になり、それらの開発が進んできており、いよいよ現実味を帯びてきた。本稿では、特に再生医療に対する、これまでの取り組みについて概説していく。

はじめに

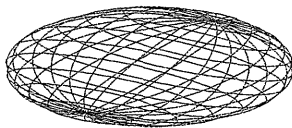
循環器領域において、現代の内科的・外科的治療では治癒不能な予後不良疾患が依然として数多くある。特に問題となるのは、心筋梗塞や心筋症などのさまざまな循環器疾患の終末像である末期心不全である。末期心不全は内科的治療にきわめて抵抗性を示し、根本的治療方法は心臓移植しかない。しかしながら、本邦においては臓器移植のための臓器提供が大幅に不足しており、また移植後に免疫抑制薬を終生内服する必要があることなど多くの問題点があり、満足のいく治療法とは言えない。

近年の基礎医学研究の進歩により、これまで治療不能とされてきたさまざまな疾患が再生医療により治療可能となるのではないかと期待されている。再生医療とは、臓器機能不全に陥った際に機能細胞を再生し、臓器の機能を回復しようとする医療である。すなわち、

体のすべての臓器・細胞を対象にした新規医療であり、さまざまな基礎研究で成功を収めてきた。しかし現状では、再生医療を一般臨床医療として実現するには、まださまざまな障壁が存在している。本稿では心筋再生医療の変遷と未来像について概説する。

再生医療のために注目される幹細胞の変遷

幹細胞とは、「自己増殖能と多分化能を有する細胞」と定義される。幹細胞は発生早期に多く存在し、組織・臓器・個体形成に貢献しており、成長に伴い減少していくことが広く知られている。また成体の中で、さまざまな臓器においても体性幹細胞として存在し、組織の修復と維持に関与していることが知られてきた。基礎研究の進歩に伴い幹細胞に対する理解が進み、近年は体性幹細胞を分離・選別し、体外で増殖・分化させた後に、病的臓器に移植する再生・細胞移植医療を確



立させようとする試みが世界中で活発になされている。

元来、成人の心筋細胞は終末分化しており、増殖能は無いとされていた。一方で近年の研究により、さまざまな実験動物、さらにヒトにおいても、低い頻度ではあっても成体心筋細胞が増殖能を示すことが示されてきた¹⁾。また、成体の心臓の中に自己増殖能と多分化能を有する心筋幹細胞が存在する可能性が示されてきた。これらの心筋幹細胞を体外で増殖させて、病気の心臓に元気な心筋細胞を移植することにより心不全の治療ができるのではないかと考えることができる。これらに関しては、日本、米国を含めたさまざまな国で小規模な臨床研究が行われているのが現状である。しかしながら、一方では「心筋幹細胞は増殖能に限られており、ヒトの末期心不全を治療し効果を得るために十分な量の心筋細胞を得ることは難しい」とも考えられている。これらの効果に対する結論を出すのは早急であり、現在もしくは今後行われていく臨床研究の結果を待ち、安全性と効果を比較検討していく必要がある。

このように、体性幹細胞は成体に存在する幹細胞であるために比較的得るのが容易であり、倫理的問題も少ないという利点があり、すでに臨床研究も行われている。一方で、体性幹細胞は存在する割合が低い、増殖能や分化能が低いといった多数の問題点が存在している。そこで、胎児由来の幹細胞である胚性幹細胞(embryonic stem cell: ES細胞)が再生医療の細胞ソースとして注目されていた。マウスやヒトにおける初期胚である胚盤胞の内部細胞塊に由来するES細胞は、増殖能や多分化能が、体性幹細胞に比べてきわめて優れていることが知られていた。1998年にヒトES細胞が初めて樹立され、いよいよ再生医療へ応用可能になるのではないかと期待が高まってきた²⁾。しかしながら、ES細胞は幹細胞としての性質は非常に秀でていますが、他人由来の細胞であるために、問題点としては移植医療に用いた場合には拒絶反応を防ぐために免疫抑制薬を用いる必要がある。また、ヒトES細胞の樹立には初期胚を破壊する必要があるために、

ヒトES細胞の樹立および使用自体に関して倫理的・法的問題が解決されていないのが現状である。

しかしながら、そのような問題を打破する研究が報告された。2006年に本邦において、マウス体細胞から人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell: iPS細胞)の樹立が初めて報告された³⁾。iPS細胞は、ES細胞に多く発現する転写因子を線維芽細胞に遺伝子導入することにより樹立される人工多能性幹細胞である。iPS細胞はES細胞とほぼ同様の能力を有しており、成体の線維芽細胞から作成可能であるために自己体細胞由来の幹細胞を作ることが可能となり、世界中に強い衝撃を与えた。翌1997年には、ヒト皮膚線維芽細胞からのヒトiPS細胞の樹立が初めて報告され、さらにヒト末梢血などからの樹立方法の開発などを経て、ますます臨床応用へ期待されるようになってきた⁴⁾⁷⁾。iPS細胞は無限に増殖可能で、心筋細胞を含めたあらゆる細胞に分化可能であり、心筋細胞移植医療への魅力的な細胞ソースである。

多能性幹細胞からの心筋細胞分化

iPS細胞が開発されてからの歴史は浅いが、ES細胞とほぼ同等の性質を有することより、心筋細胞分化誘導などに関してはES細胞を用いた研究に関する知見を応用することができる。マウスES細胞の樹立が報告されてから約4年後の1985年には、Doetschman TCらにより、ES細胞から心筋細胞が分化可能であることが報告された⁸⁾。ES細胞は初期胚に由来しており、ES細胞分化は正常の発生機構を模倣している。正常の心臓発生機構を詳細に解明し、ES/iPS細胞から心筋細胞への分化誘導に応用することにより、効率的に心筋細胞を分化誘導する方法が開発されてきた⁹⁾。また、1998年にヒトES細胞の樹立が報告され、2001年にはヒトES細胞もまた心筋細胞に分化可能であることが報告された。その頃から、ES細胞由来心筋細胞を心不全モデルの心臓に移植することにより、

末期心不全が治療できる可能性があることが期待されてきた。ES細胞を用いた再生医療を開発・実現化するために、心筋細胞分化誘導効率を高めるためのさまざまな基礎研究が行われ、さまざまな方法が提唱されてきた¹⁰⁾¹¹⁾。

2006年にマウスiPS細胞の発明後まもなく、相次いでマウスiPS細胞から心筋細胞への分化とマウスiPS細胞由来心筋細胞の解析が報告された¹²⁾。これらの報告によると、それまでの心筋細胞以外の神経細胞や血液細胞などのさまざまな報告と同様に、心筋細胞に関してもマウスES細胞と同様の分化能も示していることが判明した。ヒトiPS細胞に関してもヒトES細胞と同様に心筋細胞に分化可能であり、その機能も同様であることが示されている¹³⁾¹⁴⁾。

多能性幹細胞を用いた心筋再生療法の開発

1990年代中盤に入ると、ES細胞から心筋細胞へ分化誘導後に細胞移植を行うことを念頭に研究が進められていくこととなった¹⁵⁾。ES細胞、iPS細胞から心筋細胞を分化誘導し移植する際に、最初に問題となるのは、心筋細胞以外の細胞を排除する必要があることである。ES/iPS細胞から心筋細胞を分化誘導する際に、すべての細胞を心筋細胞に分化誘導する方法は開発されておらず、必ずほかの細胞と一緒に心筋細胞が得られることになる。移植に際して、心臓に心筋細胞以外のさまざまな細胞を移植することは理想ではなく、心筋細胞だけを純化しようと古くからさまざまな方法が開発されてきた。当初の試みとしては、心筋細胞だけに薬剤耐性遺伝子が発現するような遺伝子操作をES細胞に行い、分化誘導後に薬剤選択を行い心筋細胞だけを純化するというものであった。ヒト多能性幹細胞を用いた再生医療の開発を念頭に置いた場合には、遺伝子導入をすることは理想ではなく、臨床応用には向かない方法である。また、遺伝子操作を行わない心筋細胞純化方法として、心筋/心筋前駆細胞特異的な

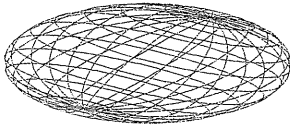
細胞表明マーカーを用いた心筋細胞の選択や、心筋細胞の特性を利用したミトコンドリア色素を用いた選択方法や、心筋細胞代謝特性を応用した心筋細胞純化培地の開発を行い¹⁶⁾¹⁷⁾、ヒトへの臨床応用を念頭に置いた方法が考案されつつある。これらの技術を用いて、心筋細胞のみを選択することが可能となり、より安全で効果的な治療方法を開発することが可能となる。

次に考えなくてはいけない問題として、移植方法がある。さまざまな臓器を対象にした細胞移植の際に常に問題となり、病的組織に細胞を注射するだけでは十分な効果が得られにくいと言われている。そこで組織工学技術を用いることにより、心筋細胞シートを作製したり、心筋細胞塊を作製した後に移植することにより、移植心筋細胞の長期生存と心機能に対する効果を期待した試みがなされている。

これらの技術を順次使うことにより、ヒトを対象にした再生医療が現実味を帯びてくる。末期心不全の患者さんから末梢血を採取し、遺伝子導入することにより、患者さん特有のiPS細胞を樹立することが可能である。このiPS細胞から心筋細胞へ分化誘導することにより、若くて元気な心筋細胞が大量に得られ、それらを心不全患者さんの心臓へ移植することにより心機能が改善する。これまでの動物実験の結果からは、ES細胞やiPS細胞由来の心筋細胞を心不全モデル動物に移植することにより、心機能の改善、生命予後の改善が確認されている。現在は世界中で、ヒトiPS細胞からの効率的で安定的な心筋細胞分化誘導方法の開発、効果的な移植技術の開発さらには腫瘍形成の有無などの安全性を検証している。これらの問題が順次解決されていくことにより、将来の再生医療が実現すると考えられる¹⁸⁾。

おわりに

循環器疾患における幹細胞を用いた再生医療においては、間葉系幹細胞、血管内皮前駆細胞、骨格筋幹細胞



胞、心筋幹細胞などの体性幹細胞が主役であった。しかしながら、ヒト iPS 細胞の樹立に伴い、循環器再生医療の主役は iPS 細胞に変わりつつある。これまでも、圧倒的な自己増殖能と多分化能を有する ES 細胞は将来の再生医療を担うと期待されていたが、自己の細胞でないことと倫理的問題から中心的存在にはなり得ていなかった。iPS 細胞は ES 細胞とほぼ同等の性質を有しており、これまでの ES 細胞を用いた基礎研究をそのまま応用することができる。心筋再生医療を実現するために、iPS 細胞から安定的に大量の心筋細胞を分化誘導する必要がある。そのためにはこれまでの ES 細胞を用いた基礎研究が有用である。また、心不全モデルへの ES 細胞由来心筋細胞移植医療の研究は多数なされており、ヒト iPS 細胞を用いた再生医療の開発を早期に実現するには、これらの知見が有用である。これらをもとに、さらなる効果の向上と安全性の検証を早期に行い、ヒト臨床研究へ移行することが期待されている。今後は、ヒト iPS 細胞から心筋細胞を工場で生産するように生み出し、安定した細胞移植・再生医療の開発へつなげていく必要がある。

◎References

- 1) Yuasa S, Fukuda K, Tomita Y, et al : Cardiomyocytes undergo cells division following myocardial infarction is a spatially and temporally restricted event in rats. *Mol Cell Biochem* **259** : 177-181, 2004
- 2) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al : Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282** : 1145-1147, 1998
- 3) Takahashi K, Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126** : 663-676, 2006
- 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* **7** : 11-14, 2010
- 5) 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
- 6) Egashira T, Yuasa S, Suzuki T, et al : Disease characterization using LQTS-specific induced pluripotent stem cells. *Cardiovasc Res* **95** : 419-429, 2012
- 7) 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. *Nat Protoc* **7** : 718-728, 2012
- 8) Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, et al : The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines : formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* **87** : 27-45, 1985
- 9) Fukuda K, Yuasa S : Stem cells as a source of regenerative cardiomyocytes. *Circ Res* **98** : 1002-1013, 2006
- 10) Yuasa S, Itabashi Y, Koshimizu U, et al : Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **23** : 607-611, 2005
- 11) 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
- 12) Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, et al : Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation* **118** : 498-506, 2008
- 13) Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, et al : Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res* **104** : e30-e41, 2009
- 14) Tanaka T, Tohyama S, Murata M, et al : In vitro pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **385** : 497-502, 2009
- 15) Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ : Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* **98** : 216-224, 1996
- 16) Hattori F, Chen H, Yamashita H, et al : Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes. *Nat Methods* **7** : 61-66, 2010
- 17) Tohyama S, Hattori F, Sano M, et al : Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell* **12** : 127-137, 2013
- 18) Yuasa S, Fukuda K : Recent advances in cardiovascular regenerative medicine : the induced pluripotent stem cell era. *Expert Rev Cardiovasc Ther* **6** : 803-810, 2008

iPS 細胞を用いた循環器診療は どこまで進んだか？

慶應義塾大学医学部循環器内科

講師 湯浅慎介
Shinsuke Yuasa

POINT

1. 2006年にマウス iPS 細胞の樹立が初めて報告され、翌 2007年にヒト iPS 細胞の樹立が報告された。ヒト多能性幹細胞が患者から容易に作成することが可能であることより、すぐに世界中で iPS 細胞を用いたさまざまな研究が始まった。
2. 研究の流れは、iPS 細胞樹立が報告された直後の基礎的な iPS 細胞解析や新規樹立方法の開発から、近年は臨床により近い研究に変わってきている。臨床応用に向けて最も期待されているものは、再生医療への応用である。末期心不全などの傷害された臓器に対して iPS 細胞由来の元気な心筋細胞を移植することによる再生医療である。
3. 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 細胞研究も盛んに行われている。iPS 細胞はゲノムにコードされたすべての遺伝情報を受け継いでおり、遺伝性疾患の原因遺伝子も受け継いでいる。心筋症患者などから iPS 細胞を樹立し心筋細胞を分化誘導することにより、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る。これらの研究結果をもとに、革新的な新規治療方法の開発が待たれる。

はじめに

2006年にマウス人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell : iPS cell) の樹立が京都大学山中伸弥教授らにより初めて報告された¹⁾。最初の

報告はマウス線維芽細胞を用いたものであり、ヒト iPS 細胞が樹立されるようになるまでに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²⁾、間もなく世界中で爆発的に iPS 細胞研究が進

み始めた。iPS細胞は体細胞から樹立可能な多能性幹細胞であり無限に増殖可能で、体内のどのような細胞にも分化することが可能である。患者体細胞からiPS細胞を樹立した場合には、自己の多能性幹細胞が得られることを意味しており、患者の遺伝情報をすべて有している細胞であるので、移植した際に免疫拒絶されることはないとされている。当初の世界的なiPS細胞研究の流れは、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³⁾。しかしながら臨床の場においてもiPS細胞は多くの期待を寄せられており、特に再生医療への応用へ向けた基礎研究が世界中で進められている。さまざま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ということが知られている。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iPS細胞が患者の遺伝情報を受け継いでいることより、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患者より体細胞を得て、同体細胞に遺伝子導入を行うことでiPS細胞の樹立を行う。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すべ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やさまざまな多型等も受け継いでいる。例えば遺伝性心筋症などの患者からiPS細胞を樹立し、培養皿上で心筋細胞を分化誘導することにより、生きたヒト心筋症心筋細胞がin vitroで容易に作る事が可能である。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期待されている。

column

初心者のための用語解説

疾患 iPS 細胞

さまざまな遺伝性疾患を有する患者から、樹立されたiPS細胞のことである。ヒトにおける遺伝性疾患に関して、原因遺伝子は大きな家系を用いた連鎖解析で決定されることが多かった。しかしながら同遺伝子変異を有している者においても、同疾患が発症しないことも多く、浸透度や多型等が原因であろうとされていた。それを検証するためにこれまでに用いられていたのが遺伝子改変マウスなどの実験動物であるが、実験動物で再現されないヒト疾患が数多く存在し、病気の原因がわからず、治療方法の開発が進んでいない疾患が多数ある。すでに疾患が発症している患者からiPS細胞を作成することにより、多型等も含めたすべての遺伝情報を引き継いだ幹細胞が入手可能で、分化誘導することにより生きた疾患細胞が無限に得られるようになった。同細胞を解析することにより、病態解明やドラッグスクリーニングが可能となる

ヒト末梢血より iPS 細胞樹立方法の確立

このようにさまざまな可能性を有する iPS 細胞だが、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、初期に開発されたヒト iPS 細胞の樹立方法は、皮膚生検を行い皮膚組織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、患者の痛み、わずかながらのリスク、そして傷跡の問題がある。特に子ども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 細胞を広く臨床応用するためには、侵襲性の低い患者検体から 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。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得られる患者検体の一つである。われわれはさまざまな検討の結果、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得ることを見出した。特にわれわれは、センダイウイルスという遺伝子の運び屋を用いることとした。センダイウイルスは広く用いられているレトロウイルスと異なりゲノムへ挿入されることなく、目的の細胞で遺伝子を発現させることが可能なウイルスである。センダイウイルスと少量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 細胞が効率的に樹立可能であることを見出した⁴⁾。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。

循環器疾患特異的 iPS 細胞の開発

iPS 細胞を再生医療に用いようとする試みは、概念としてはわかりやすく、世界中で多くの試みが成

されているが、一方で疾患 iPS 細胞研究に関しても徐々に研究が進んできている。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、2010 年末頃より相次いで報告されている循環器疾患特異的 iPS 細胞を用いた解析について概説する。

遺伝性 QT 延長症候群特異的 iPS 細胞

循環器疾患特異的 iPS 細胞研究の中でも最も早く報告されてきたものに遺伝性 QT 延長症候群がある。特に 2010 年末頃から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。心筋細胞が適切に収縮と拡張を繰り返すためには、脱分極と再分極を適切に繰り返し、電氣的恒常性を保つ必要があるが、それらは心筋細胞内のイオン濃度により調節されており、心筋細胞膜に発現するナトリウムチャネル、カリウムチャネルやカルシウムチャネルが重要な役割をしている。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言われているが、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治療ことになる。適切な動物モデルもないのが現状であり、これまでは基礎研究の進展も期待されてはなかった。ヒト iPS 細胞を用いることで 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

治療の開発を目指して、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なされている。

最初の報告はドイツのグループからのものであった⁵⁾。カリウムチャンネル遺伝子変異(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等は過去に報告されているものであり、臨床像を含めて患者由来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った⁶⁾。前述とは別のカリウムチャンネルの遺伝子変異(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ンネルの異常によりカリウム電流の低下を来すことがわかっている。iPS細胞由来心筋細胞から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、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ン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。またカリウムチャン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⁷⁾。本研究においては、カルシウムチャンネル遺伝子変異(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ンネルの不活性化障害を来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来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ン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。

われわれは新規変異(KCNQ1 1893delC)を有するLQT type1患者よりiPS細胞樹立を行い、機能解析を行った⁸⁾。過去の疾患iPS細胞の機能解析の多くは既知の変異を有する患者からの樹立と機能解析で、過去の報告と整合性が得られているというものである。われわれは臨床でしばしば認める新規変異が疾患iPS細胞で機能解析できるかを検討した。iPS細胞を樹立し、心筋細胞に分化誘導を行い、電気生理学的性質を比較検討した。多電極記録(MEA)システムを用いて分化誘導した心筋細胞の細胞外電位を記録したところ、QT延長症候群患者由来の心筋細胞では、体表面心電図のQT時間に相当するとされる細胞外電位持続時間(FPD)の有意な延長が確認された。次に遅延整流性Kチャンネル遮断薬の薬物反応試験を行ったところ、即時型遅延整流性Kチャンネル(IKr)遮断薬であるE4031投与により、QT延長症候群患者由来の心筋細胞ではFPDの延長とともに、有意に早期後脱分極(EAD)様の不整脈が誘発された。さらに高濃度のE4031投与により、健常

者には見られない多形性心室頻拍 (TdP) 様の不整脈が誘発された。この結果は、本患者における K 電流は、健常者に比し IKr に強く依存していることを示唆している。また緩徐型遅延整流性 K チャネル (IKs) 遮断薬である Chromanol 293B の投与を行ったところ、健常人由来の心筋細胞の FPD が有意に延長したのに対し、患者由来の心筋細胞では FPD の延長が見られなかった。これらの結果より、IKs チャネルの機能喪失が疑われた。また β 受容体刺激薬の投与により、QT 延長症候群患者由来の心筋細胞において心室頻拍 (VT) 様の不整脈が誘発され、 β 受容体遮断薬の投与により不整脈が停止する現象が確認され、同様に IKs チャネルの機能不全を示唆する所見と考えられた。直接 IKs 電流を測定するためにパッチクランプ法を用いて iPS 細胞由来心筋細胞に行い IKs 電流を記録したところ、1893delC のヘテロ変異を有する患者特異的 iPS 細胞由来心筋細胞において有意な IKs 電流の低下が確認された。また患者特異的 iPS 細胞由来心筋細胞の IKs チャネルの免疫染色により、1893delC のヘテロ変異において細胞膜表面の IKs チャネルの発現が著明に低下していることが確認され、チャネルの trafficking 異常が確認された。以上のことより、患者特異的 iPS 細胞を用いて新規変異の機能解析が可能であることが示唆された。

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。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、心病変が最も生命予後に影響を与える。LEOPARD 症候群の 90% 程度に、SHP2 という脱リン酸化酵素をコードしている PTPN11 遺伝子異常が認められる。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、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、生存や分化などのさまざまな生命現象に異常を来す。本研究においても PTPN11 遺伝子異常を認めている典型的 LEOPARD 症候群である⁹⁾。LEOPARD 症候群の 80% は肥大型心筋症を呈することが知られ、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・開発することが重要である。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している。LEOPARD 症候群 iPS 細胞由来心筋細胞は、健常人と比し肥大していくことが判明した。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来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ときにこれらの細胞内シグナルの活性化が低下していると言われている。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た。LEOPARD 症候群の原因というのは Ras-MAP キナーゼ系の活性化の低下であると言われているが、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。

拡張型心筋症は最も頻度が多く予後が悪い遺伝性心筋疾患の一つである。サルコメア構成タンパクの一つであるトロポニン T に変異のある (TNNT R173W) 拡張型心筋症患者より iPS 細胞を作成した後に機能解析を行い報告されている。同報告においては、患者特異的 iPS 細胞由来心筋細胞において細胞内 Ca^{2+} 濃度の恒常性に異常を認め、また収縮能の

低下を認めている。同細胞において β ブロッカーの投与や、Serca2a 遺伝子の過剰発現により機能回復を認めている。同報告においては疾患特異的 iPS 細胞を用いることにより、in vitro において疾患表現形の再現ができ疾患発症機序の解析やドラッグスクリーニングの基盤的技術となりえる可能性が示唆されている。

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見えるが、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。そのために、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、さまざまな難治

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。1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。

参考文献

- 1) Takahashi, K. et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 126 (4) , 2006, 663-76.
- 2) Takahashi, K. et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 131 (5) , 2007, 861-72.
- 3) Yuasa, S. et al. Recent advances in cardiovascular regenerative medicine : the induced pluripotent stem cell era. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 6 (6) , 2008, 803-10.
- 4) Seki, T. et al. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Terminally Differentiated Circulating T Cells. *Cell Stem Cell*. 7 (1) , 2010, 11-4.
- 5) Moretti, A. et al. Patient-Specific Induced Pluripotent Stem-Cell Models for Long-QT Syndrome. *N Engl J Med*. 363 (15) , 2010, 1397-409.
- 6) Itzhaki, I. et al. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature*. 471(7337) , 2011, 225-9.
- 7) Yazawa, M. et al. Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome. *Nature*. 471 (7337) , 2011, 230-4.
- 8) Egashira, T. et al. Disease characterization using LQTS-specific induced pluripotent stem cells. *Cardiovasc Res*. 95 (4) , 2012, 419-29.
- 9) Carvajal-Vergara, X. et al. Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature*. 465 (7299) , 2010, 808-12.

Original Article

The generation of induced pluripotent stem cells from a patient with *KCNH2* G603D, without LQT2 disease associated symptom

Shinichiro Okata^{1,2)}, Shinsuke Yuasa¹⁾, Teiichi Yamane³⁾, Tetsushi Furukawa²⁾ and Keiichi Fukuda¹⁾

1) Department of Cardiology, Keio University School of Medicine, Japan.

2) Department of Bio-informational Pharmacology, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Japan.

3) Department of Cardiology, The Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan

The long QT syndrome type 2 (LQT2) is inheritable life threatening arrhythmic disorder and one of the most common genetic variants in long QT syndrome. There are some indications for treatment of the patients with LQT2 but it is impossible to completely prevent fatal arrhythmia. To develop novel therapy for the patients with LQT2, it has been desired to generate disease-specific and patient-specific disease model. Human induced pluripotent stem (iPS) cells are somatic cell-derived pluripotent stem cells with infinite proliferation ability and multipotency. Patient-specific iPS cells can be derived from patient somatic cells, have all genomic information encoded in patient's genome including mutation and all SNPs, and can be ideal disease models of the patients. To generate disease model for LQT2 by iPS cells, we should firstly generate iPS cells from the patient with LQT2 and confirm the genomic mutation in iPS cells. In this study, we showed the successful generation of iPS cells from a patient with *KCNH2* G603D mutation. The patient specific iPS cells properly expressed stem cell markers, such as NANOG and OCT3/4. We also confirmed that the *KCNH2* G603D (G1808A) mutation was taken over in patient specific iPS cells. These patient-specific iPS cells may contribute to the future analysis for disease

pathogenesis and drug innovation.

Key words: iPS cell, Long QT syndrome, Disease modeling

Introduction

The generation of induced pluripotent stem (iPS) cell is firstly reported in 2006 with great surprise¹. Human iPS cells are similar to human embryonic stem (ES) cells in terms of proliferation and differentiation ability, and can be generated from adult somatic cells^{2,3}. Now we can easily generate iPS cells from patient's somatic cells and those iPS cells have all genomic information of the patient genome⁴. Many human diseases are caused by genomic mutation. Disease modeling using human iPS cells is newly emerged research field to analyze genetic human diseases⁷. Actually, there are many fatal genetic diseases without effective therapy. To develop newly effective therapies for those diseases, first of all we have to generate disease models. In the past, there had been solely animal models of human genetic disease, such as specific gene knockout mice, transgenic mice and autochthonous diseased animals. Although those models gave us many valuable information regarding to the mechanisms of human genetic diseases, most crucial problem is that those models are not human. So it is often difficult to model human diseases using experimental animals. In another important point of view, among humans, each individual shows highly rich in genomic diversity in terms of racial differences and single nucleotide polymorphisms (SNPs). So it has been highly expected to generate not only disease-specific models, but also disease-specific and patient-specific disease models. To

Corresponding Author: Shinsuke Yuasa, M.D, Ph.D.
Assistant Professor, Department of Cardiology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi Shinjuku-ku, Tokyo, 160-8582, Japan.
Tel: +81-3-5363-3373 Fax: +81-3-5363-3875
E-mail: yuasa@a8.keio.jp
Received September 27 ; Accepted November 16, 2012