

希少難治性心疾患由来iPS細胞の樹立に関する研究

研究代表者 王 英正 岡山大学病院教授

研究要旨

左心低形成症候群における姑息的心臓手術後の長期予後を予測する診断法は確立されていない。臨床的に術後成績を規定する要素として、房室弁逆流や蛋白漏出性腸症の併発があるが、遅発性のため術後早期における予測は困難である。本研究によって、疾患特異的iPS細胞を樹立することにより、病態発症前に初期化し培養細胞系において、経時的に房室弁や心臓の四腔形成に重要な各種転写因子を網羅的に解析することで、術後の遅発性心臓合併症を予測する。

研究分担者：

佐野 俊二

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

本研究では、申請者らがこれまでに樹立してきた6株の疾患特異的iPS細胞（左心低形成症候群5株と二心室心1株）を心筋細胞に分化誘導させ、網羅的遺伝子解析で得られた左心低形成症候群に固有な心臓発生転写因子群の発現パターンに注目し、心臓手術後の継続的な臨床疫学調査データと照合することで、術後心不全の再発や心不全死の独立予後規定因子を解明する。

A. 研究目的

単心室循環を示す左心低形成症候群は1万人に1人の頻度で年間約1,000人が出生し、米国では小児心臓移植適応例の約半数が本疾患に属するように極めて予後が不良の希少難治性心疾患である。一方、乳幼児における心臓移植の実績がない我が国では、生後直後より3期にわたる心臓手術が唯一の治療法であり、10年生存率は約60%と限界がある。このため、標準外科的治療後の中長期における生命予後を予測する方法を開発することは、治療戦略上、心臓移植適応候補者を選定する面からも重要な研究課題である。

B. 研究方法

1. 疾患特異的iPS細胞の樹立と心臓発生異常の機序解明

申請者らはこれまでに90症例以上の先天性心疾患由来の心臓内幹細胞を単離培養し、左心低形成症候群固有の転写因子発現様式について明らかにした。しかしながら、すでに病態発症している組織細胞では、ヒト心臓発生初期における転写因子群の異常について

大部分において集約することは可能であるが、臨床上孤発性疾患が多い左心低形成症候群に対しては、前駆細胞を用いた解析法により個々の疾患における起因遺伝子を同定することは困難である。

一方、iPS細胞作製技術は、既に疾患を発症した患者の体組織細胞を初期化することで、疾患発症前に遺伝子情報をリセットでき、かつ継時的に疾患発症にかかわる遺伝子発現異常を網羅することができる。申請者らは5株の疾患特異的iPS細胞を用いて、単心室心の解剖発生学的異常を規定する4つの転写因子群（NKX2.5, ISL1, TBX5, HAND2）の発現が著明に低下し、収縮能が著しく障害されていることを明らかにした。

本研究では、初年度に合計8株以上の左心低形成症候群由来のiPS細胞を樹立し、流入路や流出路閉鎖を伴う重篤性が高い本疾患の心臓発生異常に関わる分子制御機序について網羅的に解明する。

本研究で得られたiPS細胞や疾患情報は、「疾患特異的iPS細胞研究事業拠点」に寄託し提供する。

2. 臨床疫学データと同定した転写因子群の異常との連結統合的解析

心臓手術後における心不全症状の再燃や心不全死の有無を中心に、iPS細胞の機能解析した全症例に関する房室弁逆流の遅発性発症や蛋白漏出性腸症の合併について追跡調査する。

本研究班を共同研究拠点とし、疫学調査成果を評価後、「次世代遺伝子解析による希少難治性循環器疾患の診断治療法の開発」研究班に情報提供し、予後診断ガイドラインを作成する。

（倫理面への配慮）

本研究に携わるすべての者は、ヒトを対象とする全ての医学研究が準拠すべき「世界医師会ヘルシンキ宣言」（1964年第18回世界医師会ヘルシンキ総会で起草、2008年10月WMAソウル総会で最新修正）を順守して行う。

疫学研究の適正な推進のため、「疫学研究に関する倫理指針」（平成20年12月1日一部改正）を順守し、研究対象者の個人の尊厳と人権を守る。

各関係者は臨床研究を遂行にあたり、「臨床研究に関する倫理指針」（平成20年厚生労働省告示第415号）を遵守して行う。

ヒト心臓組織の入手は、外部委員を含めた岡山大学倫理委員会にて審査承認されたプロトコル（承認766号）に従順し、「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」（平成10年厚生科学審議会答申）を遵守する。患者さんへのインフォームドコンセントを徹底して行い、患者さんの同意のもと不要となった余剰組織を研究開発に使用する。

個人情報の保護を最優先し、ヒト組織の取り扱いに関する資料の提出及び調査には積極的に協力する。また、提供していただいたヒト組織は幹細胞の分離のみに全て使用し、倫理委員会で承認されていない研究目的には一切使用しない。

患者さん由来末梢血からiPS細胞の樹立は岡山大学倫理委員会で承認され（承認c13003号）遺伝子組み換え実験（承認9068号）やレトロ及びレンチウイルスの感染はP2レベルの実験室で行い、移植された動物は隔離した遺伝子操作動物管理施設にて飼育を行う。

動物実験計画書（承認389号）に従い、動物施設への実験動物の導入に当たっては、必要に応じて適切な検疫、隔離飼育等を行うこと

により、実験実施者、飼養者及び他の実験動物の健康を損ねることのないように講じる。臨床疫学研究に参加する患者さんへのインフォームドコンセントを徹底して行い、研究内容に関する説明と理解を得る。同意書原本は説明文書と共にカルテに添付して岡山大学病院で保管する。同意の撤回が生じた場合は、同意撤回文書をデータセンターにも提出する。症例登録はデータセンターとして臨床研究情報センターにおき中央登録制とする。使用する被験者識別コードは施設において個人情報を含まず、一意となる任意コードを用いる。マウス及びラットの使用実験は、動物愛護の条約精神に則り、動物を適切な麻酔下で手術及び移植行為を行う。心標本の取り出し等の状況においても、動物の安楽死を最重要事項として守り、動物の虐待を避ける。

C. 研究結果

患者由来心臓内幹細胞(CPCs)から、合計10株の疾患特異的iPS細胞(うち、左心低形成症候群(HLHS)8株及び二心室心患者(総肺静脈環流異常症、心室中隔欠損症)由来iPS細胞2株)を樹立した。

樹立したiPS細胞は、各種未分化転写因子群(OCT4、SSEA3、SSEA4、TRA-1-60、TRA-1-81、NANOG)を発現し、アルカリフォスファターゼ染色陽性だった。

OCT4とNANOGのプロモーター領域におけるDNA脱メチル化解析では、いずれのiPS細胞株においても、初期化前のCPCsに比べ、著明に脱メチル化していた。

網羅的遺伝子解析では、樹立したiPS細胞は、OCT4やNANOGをはじめ、胚性幹細胞や京都大学で樹立したiPS細胞である201B7と類似した遺伝子発現パターンを示した。核型解析

では、両疾患由来のiPS細胞とも染色体異常は認めなかった。三胚葉成分を伴う奇形腫を形成した。

次に、iPS細胞に心筋分化誘導を行った。両疾患由来の株で免疫染色にてサルコメア構造をもつTroponin-T陽性細胞を確認した。さらに、Troponin-Tの発現量をリアルタイムPCRで解析すると、HLHS由来の心筋細胞では、コントロール細胞に比べ、3週目でその発現が有意に低下していた。

この発現量の差の原因を検討するため、ダイレクトシーケンス法にてNKX2-5、HAND1、NOTCH1の遺伝子変異を解析した。結果、NKX2-5で1箇所、NOTCH1で5箇所の同義一塩基多型(SNPs)を認めたが、遺伝子変異は認めなかった。

次に、iPS細胞からの心筋分化誘導過程における心臓発生関連転写因子群の変化をリアルタイムPCRで経時的に解析した。HLHS由来のiPS細胞は、コントロール細胞に比べ、心臓の初期発生に関与するNKX2-5、HAND1、HAND2、房室管と弁形成に関与するTBX2、NOTCH1、HEY1、HEY2、そして左室流出路形成に関与するNOTCH1、HEY1、HEY2において、その発現量が著明に抑制されていた。

さらに、エピジェネティック機序を介した転写制御を調査するため、CPCs、未分化iPS細胞、iPS由来心筋細胞を用いてクロマチン免疫沈降を行った。CPCsと未分化iPS細胞では差は認めなかったが、HLHS-iPS由来心筋細胞で、NKX2-5のプロモーター領域におけるdimethylated histone H3-lysine 4 (H3K4me2)とacetylated histone H3 (acH3)が二心室心由来心筋細胞に比べ、有意に減少していた。逆に、trimethylated H3-lysine 27 (H3K27me3)は二心室心由来心筋細胞に比べ、有意に

増加していた。

疾患特異的iPS細胞を用いて同定された上記の病態形成に関わる候補の転写因子群であるNKX2-5、NOTCH1、HAND1について、gain及びloss of functionの検討を加えた。心筋特異的構造蛋白であるTNT2及びNPPAのプロモーター解析では、NKX2-5、NOTCH1、HAND1の一過性過剰発現により活性が相乗的に上昇し、二心室心由来iPS細胞ではこれらを個別に抑制するshRNAの導入により、プロモーター活性が有意に低下した。

D. 考察

我々は、合計10株の先天性心疾患特異的iPS細胞の樹立に成功した。先天性心疾患は、その多くが孤発性であり、また疾患モデルの形成が困難なことから、病態解析が難渋している。疾患特異的iPS細胞を用いての心筋分化誘導は、心臓発生過程をin vitroで再現でき、疾患発症前からの病態発生を経時的に解析することが可能となる。

ダイレクトシーケンス法により、これらの検体に帰存する各疾患に関して、遺伝子変異は認めず、遺伝的原因は否定的であった。

包括的な遺伝子解析により我々は、HLHS疾患特異的iPS細胞からの心筋分化誘導過程で、心臓の初期発生に関与するNKX2-5、HAND1、HAND2、房室管と弁形成に関与するTBX2、NOTCH1、HEY1、HEY2、左室流出路形成に関与するNOTCH1、HEY1、HEY2の発現が著明に抑制されていることを突き止めた。

そこで行ったエピジェネティック機構解析では、我々はHLHS由来心筋細胞で、NKX2-5のプロモーター領域のヒストン修飾の異常を突き止めた。これらの結果から、左室流出路の低形成や左心室自体の形成不全が原因と言われるHLHS

において、心臓発生に関わる各種転写因子群の発現低下と、その転写活性を制御しているヒストン修飾の異常が、複雑心奇形疾患の発症における規定因子群であることが示唆された。

さらなる詳細な心筋構造蛋白のプロモーター(TNT2, NPPA)解析により、NKX2-5, NOTCH1, HAND1が集約的に病態発症に関わる最も重要な転写因子群であることを突き止めた。これらの転写因子群は相乗的に心臓の器官形成に関わり、心臓の心室流出路、中隔形成や弁形成に必須であることが既知の心臓発生学的知見とよく一致する。

E. 結論

これまで各種転写因子群の遺伝子欠損モデルの表現型解析で報告された表現型とは一部類似しているものの、ヒトにおける臨床病態像は単一の遺伝子の発現異常だけでなく、複合的な転写因子群(NKX2-5, HAND1, NOTCH1)の密接で一連の発現調節との相関関係が臨床病態の形成に関与していることが明らかとなった。

今後、各症例の長期臨床像の予後を追跡しつつ、流出路、中隔形成ならびに弁形成などといった心臓内における各種部位の発生に基づく臨床病態像や臨床疫学調査との関連を詳細に探求する。さらに、本研究期間内で樹立した各種疾患特異的iPS細胞を駆使して、難治性疾患の長期的臨床疫学調査研究に応用する革新的予後診断法の開発に向けた研究を行う。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ogata T, Naito D, Nakanishi N, Hayashi YK, Taniguchi T, Miyagawa K, Hamaoka T, Maruyama N, Matoba S, Ikeda K, Yamada H, Oh H, Ueyama T. MURC/Cavin-4 facilitates recruitment of ERK to caveolae and concentric cardiac hypertrophy induced by α 1-adrenergic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(10):3811-6.

Tarui S, Sano S, Oh H. Stem cell therapy in patients with single ventricle physiology.

Methodist DeBakey Cardiovascular Journal, 2014 (in press).

樽井俊、佐野俊二、王 英正 心筋幹細胞を用いた先天性心疾患に対する心筋再生医療
月刊循環器 9月号 3(9): 69-76 医学出版(2013)

2. 学会発表

王 英正 先天性心疾患に対する自己心臓内幹細胞による再生医療 第116回日本小児科学会学術集会 広島 (2013.4.19)

Oh H, Tarui S, Ohtsuki S, Sano S.

Intracoronary delivery of cardiac progenitor cells in patients with hypoplastic left heart syndrome. The 30th International Society for Heart Research (2013. 6.29) San Diego.

王 英正 心不全への幹細胞移植療法 第3回先端医学研究会 at OU 直島 (2013.8.3)

王 英正 心不全への幹細胞移植療法 岡山先端医学研究会 岡山 (2013.7.19)

王 英正 希少難治性心不全への心臓内幹細胞を用いた再生医療 青森臨床循環器研究会 青森 (2013.10.26)

王 英正 希少難治性心不全に対する心臓

内幹細胞を用いた再生医療 岡山大学知恵の見本市2013 岡山 (2013.11.1)

王 英正 子どもの難治性心不全に対する幹細胞移植療法の取り組み 公開セミナーはあとネット兵庫 神戸市 (2013.11.24)

Factors-based human cardiomyocytes differentiation exhibits defective maturation and excitation through aberrant calcium handling proteins. Tarui S, Kobayashi J, Hirata M, Yoshida M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, Oh H. *The 21st annual meeting of the Asian society for cardiovascular and thoracic surgery*, Kobe (2013. April. 7)

Patient-specific induced pluripotent stem cells recapitulate the models of hypoplastic left heart syndrome. Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, K Takahashi, K Naruse, Sano S, Oh H. *The 21st annual meeting of the Asian society for cardiovascular and thoracic surgery*, Kobe (2013. April. 7)

Cardiac progenitor cell therapy in patients with hypoplastic left heart syndrome. S Sano, H Oh, S Tarui, S Ohtsuki, S Kasahara. *American Association for Thoracic Surgery*. Minneapolis. (2013. May 4)

Lineage induction of patient-specific iPS cells identifies the cardiac transcriptional repression during myocardial growth and patterning in HLHS. Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, K Takahashi, K Naruse, Sano S, Oh H. *TAKAO Symposium Tokyo* (2013. July. 16)

Directed differentiation of patient-specific

induced pluripotent stem cells identifies the cardiac transcriptional repression during myocardial growth and patterning in hypoplastic left heart syndrome. Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, K Takahashi, K Naruse, Sano S, Oh H. *American Heart Association Suppl.* (2013). Dallas

疾患特異的 iPS 細胞の樹立と左心低形成症候群の心臓発生異常の解明 小林純子, 樽井 俊, 平田昌敬, 川畑拓也, 黒子洋介, 立石篤史, 吉積 功, 新井禎彦, 笠原真悟, 佐野俊二, 王 英正 日本外科学会 Young Researcher Award (2013)

樽井俊、佐野俊二、王 英正 左心低形成症候群に対する心臓内幹細胞を用いた自家移植療法 第 13 回心血管再生外科治療研究会 熊本 (2.19.2014)

奥山倫弘, 逢坂大樹, 石神修大, 小林純子, 笠原真悟, 佐野俊二, 王 英正 3D 細胞外マトリックスを利用したヒト幹細胞再播種によるバイオ人工心臓の作成 日本再生医療学会 京都 (3.5.2014)

樽井俊、石神修大、大月審一、逢坂大樹、栄徳隆裕、近藤麻衣子、小林純子、奥山倫弘、馬場健児、川畑拓也、吉積 功、黒子 洋介、新井禎彦、岩崎達雄、佐藤修平、笠原真悟、佐野俊二、王 英正 左心低形成症候群に対する心臓内幹細胞自家移植療法：第 1 相試験 (TICAP) 日本再生医療学会 京都 (3.5.2014)

小林純子, 吉田 賢司, 樽井 俊, 永井祐介, 笠原真悟, 成瀬恵治, 伊藤 浩, 佐野俊二, 王 英正 患者由来 iPS 細胞を用いた左心低形成症

候群における疾患発症機序の解明 日本再生医療学会 京都 (3.5.2014)

Junko Kobayashi, Masashi Yoshida, Suguru Tarui, Yusuke Nagai, Shingo Kasahara, Keiji Naruse, Hiroshi Ito, Shunji Sano, Hidemasa Oh Assessment of genetic and epigenetic modifications in hypoplastic left heart syndrome by disease-specific iPS cells 第 78 回 日本循環器学会総会学術集会 *Circulation Journal* (2014.3.21) 東京

Suguru Tarui, Shinichi Ohtsuki, Daiki Ousaka, Takahiro Eitoku, Maiko Kondo, Junko Kobayashi, Michihiro Okuyama, Shunta Ishigami, Kenji Baba, Sadahiko Arai, Takuya Kawabata, Ko Yoshizumi, Yosuke Kuroko, Tatsuo Iwasaki, Shuhei Sato, Shingo Kasahara, Shunji Sano, and Hidemasa Oh. Intracoronary Cardiac Progenitor Cell Transfer to Treat Univentricular Heart Disease: A Phase 2 Randomized Controlled Clinical Trial (PERSEUS) 第 78 回 日本循環器学会総会学術集会 *Circulation Journal* (2014) 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

Preparation for treating heart disease used in cell therapy. Patient No: US8414924 B2, Apr. 9. 2013.

細胞移植療法に用いられる心疾患治療薬 特許第5496675号 2014年3月14日登録

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。