

201442012A

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患実用化研究事業

ゲノム解析技術および疾患特異的iPS細胞を用いた
心筋症に対する革新的な医薬品開発研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 小室 一成

平成27（2015）年 3月

本報告書は、厚生労働省の難治性疾患実用化研究事業による委託業務として、国立大学法人東京大学が実施した平成26年度「ゲノム解析技術および疾患特異的 iPS 細胞を用いた心筋症に対する革新的な医薬品開発研究 (H26-委託 (難) -一般-012)」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
ゲノム解析技術および疾患特異的iPS細胞を用いた	1
心筋症に対する革新的な医薬品開発研究	
小室 一成	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. 心筋症患者のゲノム解析	10
油谷 浩幸	
2. 心筋症患者のiPS由来心筋細胞解析	13
李 鍾國	
3. 心筋症の革新的な治療法開発	17
内藤 篤彦	
III. 学会等発表実績	21
IV. 研究成果の刊行物・別刷	29

厚生労働科学研究委託費(難治性疾患実用化研究事業)
委託業務成果報告(総括)

ゲノム解析技術および疾患特異的iPS細胞を用いた
心筋症に対する革新的な医薬品開発研究

業務主任者 小室 一成 東京大学医学部附属病院 教授

研究要旨:

心筋症は心機能障害を伴う心筋疾患と定義されている難治性疾患である。ゲノム異常が原因で心筋細胞に起こる異常のために発症することが推測されているが、その病態については不明な点が多く、病態に根ざした治療薬の開発は進んでいない。心筋症に対する革新的な治療薬を開発するためには、心筋症患者のゲノムおよび心筋細胞の異常を解明することが必要である。一方、本邦において心筋症患者のゲノム異常を戦略的に解析した研究は無く、ゲノム異常がヒト心筋細胞に与える影響を解明することはこれまで技術的に不可能であった。

本研究の目的は、本邦における心筋症患者のゲノムおよび心筋細胞の異常を戦略的に把握することで有効な治療法を開発することである。そのために本研究では、ゲノム解析を通じて本邦の心筋症患者で認められるゲノム異常を明らかにし、心筋症 iPS 由来心筋細胞解析を通じて、心筋症患者の心筋細胞で認められる異常を明らかにし、ゲノム異常が細胞異常を引き起すメカニズムを明らかにする。さらに、心筋症 iPS 由来心筋細胞を用いたスクリーニング系を確立し、製薬企業と共同で新たな心筋症治療薬を開発する。

業務分担者

国立成育医療研究センター・所長
松原 洋一
国立循環器病研究センター・部長
北風 政史
東京大学先端科学技術研究センター・教授
油谷 浩幸
東北大学医学部・准教授
青木 洋子
東京大学医学部附属病院・特任准教授
森田 啓行
大阪大学大学院医学系研究科・寄附講座
准教授
李 鍾國
東京大学医学部附属病院・特任助教
内藤 篤彦
東京大学医学部附属病院・特任研究員
野村 征太郎

A. 研究目的

本研究はゲノム解析を通じて心筋症患者で認められる遺伝子変異の種類および頻度を解明し、心筋症患者から樹立された iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞の表現型解析を通じて心筋症の病態を解明し、iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞を用いたスクリーニング系を開発し、開発した創薬スクリーニング系を用いて製薬企業と共同で心筋症に対する創薬を実施し、同定した遺伝子異常および iPS 由来心筋細胞の異常を個々の心筋症患者の予後予測や治療方針決定等に应用するための戦略を確立することで、現時点では病態が明らかでなく根本的な治療法が存在しない心筋症に対する革新的な治療戦略を開発することを目的とする。

このうち、独立行政法人国立成育医療研究センター、独立行政法人国立循環器病研究センター、国立大学法人東北大学ではこれまで構築された全国の医療機関との研究ネットワークを通じて症例を選択し、文部科学省「疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究」への紹介を実施する。国立大学法人大阪大学

ではiPS由来心筋細胞の電気生理学的解析を実施する。国立大学法人東京大学ではプロジェクトの総合的推進、心筋症患者のゲノム解析、iPS由来心筋細胞の生理機能および形態に関する表現型解析、iPS由来心筋細胞を用いたスクリーニング系開発、製薬企業との新規心筋症治療薬の共同開発を実施する。

また、国立大学法人東京大学、国立大学法人大阪大学、独立行政法人国立成育医療研究センター、独立行政法人国立循環器病研究センター、国立大学法人東北大学は、遺伝子変異データおよびiPS由来心筋細胞解析データのパーソナル医療への応用、心筋症治療薬が新規開発された際の臨床試験を共同で実施する。

B. 研究方法

① プロジェクトの総合的推進

研究ネットワークにおける症例の収集を円滑に進めるために定期的にメール等を通じて連絡する。紹介を受けた症例のゲノム解析結果およびiPS由来心筋細胞の表現型について研究ネットワークへのフィードバックを行い、次年度以降に実施するパーソナル医療への応用検討に向けた基盤を確立する。プロジェクトで得られた研究成果についてホームページ等を通じて積極的の公表し、今後の展開に資する。

② 研究ネットワークの構築と症例の収集

過去の厚生労働省難治性疾患等克服研究事業で確立されたネットワークを活用して症例を収集する。研究ネットワークにおける症例の収集はメール等を通じて実施し、研究代表者である小室が症例の選択と優先順位の決定を行う。平成26年度はゲノム解析症例を50症例収集し、文部科学省「疾患特異的iPS細胞を活用した難病研究」に収集した10症例からのiPS細胞樹立を依頼する。

③ 心筋症患者のゲノム解析

a. 既知遺伝子変異のスクリーニング

収集した症例の中から明らかな二次性心筋症を除外し、既知心筋症原因遺伝子のスクリーニングを実施する。心筋症発症との因果関係が既に報告されている95遺伝子の99.43%をカバーするパネルを既に作成済みであり、東京大学先端技術研究センターに設置されている次世代シーケンサーを用いて既知心筋症原因遺

伝子のシーケンシングを行う。平成26年度は50症例の解析を行う。

b. 新規遺伝子変異の探索

既知遺伝子変異をスクリーニングした結果、既知遺伝子変異が認められなかった症例の中から、家族歴が濃厚で家系内から複数症例（発症者以外に発症者1名以上、非発症者1名以上）のゲノムの収集が可能である場合は、Exome-sequencingを通じて責任遺伝子の同定を行う。平成26年度は既知遺伝子変異のスクリーニングの結果から新規遺伝子変異探索の対象となる症例を検討する。

④ 心筋症患者のiPS由来心筋細胞解析

a. iPS由来心筋細胞の表現型解析

文部科学省「疾患特異的iPS細胞を活用した難病研究」で心筋症患者から樹立されたiPS細胞から分化誘導した心筋細胞を解析し、形態・生理機能に関する基本的なデータを採取する。遺伝子変異が明らかになっている症例については、iPS由来心筋細胞を用いて心筋症患者の遺伝子変異が心筋細胞の異常を引き起すメカニズムを解明する。平成26年度は心筋症患者から樹立したiPS細胞10クローン以上から分化誘導した心筋細胞の解析を実施する。

b. iPS由来心筋細胞を用いたスクリーニング系の開発

心筋症患者から樹立されたiPS細胞から分化誘導した心筋細胞の異常な表現型を検出可能な解析系をもとに、S/N比が大きく再現性の高いスクリーニング系を開発する。平成26年度には形態に関する表現型スクリーニング系を確立する。また、生理機能に関する解析系からスクリーニング系の確立を目指すために基礎的なデータを採取するとともに、秘密保持契約を締結した上で製薬企業3社以上にプレゼンテーションを実施し、スクリーニング系の共同開発と以降の創薬スクリーニングの実施を募る。

⑤ 心筋症の革新的な治療法開発

心筋症iPS由来心筋細胞を用いた創薬スクリーニング

秘密保持契約を締結した製薬企業各社に対して④b.で確立したスクリーニング系についてプレゼンテーションを行い、心筋症治療薬開発に関心を示す製薬企業を募集する。応募した

製薬企業にiPS細胞技術およびスクリーニング系を移管し、同社のライブラリーを用いたスクリーニングを実施する。現時点で国内製薬企業二社と秘密保持契約を締結している。平成26年度に創薬スクリーニングを実施する予定は無いが、④b. で記載した形態に関する表現型スクリーニング系について創薬スクリーニングを実施する製薬企業への技術移管を行う。

C. 研究結果

① プロジェクトの総合的推進

メール等を通じて連絡を行い、ゲノム解析症例およびiPS細胞樹立症例を選定した。ゲノム解析およびiPS由来心筋細胞の表現型について打ち合わせを行い、フィードバックを行うための準備を行った。自己経費を利用してプロジェクトで得られた研究成果について公表するためのホームページ作成の準備を行った。

② 研究ネットワークの構築と症例の収集

過去の厚生労働省難治性疾患等克服研究事業で確立されたネットワークを活用して症例を収集した。本年度は東京大学医学部附属病院を中心に症例を収集し、40症例からゲノムDNAを採取した。また、文部科学省「疾患特異的iPS細胞を活用した難病研究」に収集した20症例からのiPS細胞樹立を依頼した。

③ 心筋症患者のゲノム解析

a. 既知遺伝子変異のスクリーニング

収集した症例の中から明らかな二次性心筋症を除外し、23症例から採取したゲノムに関して既知心筋症原因遺伝子のスクリーニングを実施した。アジレント社が提供するHaloplex専用解析ツールSureCallを用いて解析し、549ヶ所の変異を同定した。

b. 新規遺伝子変異の探索

24症例のエクソームシーケンシングを行った。Haloplex法で同定していた既知遺伝子領域における変異が同様に確認され、解析手法の妥当性を確認するものとなった。既知遺伝子以外の部位についても解析を行い、新規遺伝子変異の探索を進めている。

④ 心筋症患者のiPS由来心筋細胞解析

a. iPS由来心筋細胞の表現型解析

文部科学省「疾患特異的iPS細胞を活用した難病研究」で心筋症患者から樹立されたiPS細胞から分化誘導した心筋細胞を解析し、形態・生理機能に関する基本的なデータを採取した。健常ボランティア2名、健常血縁者1名、肥大型心筋症患者5名、拡張型心筋症患者6名から樹立したiPS細胞の合計22クローンを、全く同一のプロトコル・スケジュールで3回以上分化誘導～解析を行った。

肥大型心筋症患者から樹立したiPS細胞を分化誘導した心筋細胞特異的の形態をハイコンテツ解析機器で解析したところ、疾患特異的に出現するパラメータがいくつか存在することが明らかになった。また、そのパラメータが「iPS細胞を利用した肥大型心筋症診断法」に応用可能か検討したところ、陽性的中率は0.88と従来の肥大型心筋症診断法と同様かそれ以上に高い値を示した。また、拡張型心筋症患者から樹立したiPS細胞を分化誘導した心筋細胞に負荷をかけた際に心筋細胞のホメオスタシス維持に重要な役割をはたすタンパクが拡張型心筋症患者iPS細胞では低下しており、その発現低下をハイコンテツ解析機器で定量できることが明らかになった。

イメージング技術を用いた収縮・拡張評価では、分化誘導のバッチ間差やwell間差、well内の場所間差が大きく、疾患特異的な表現型は明らかにすることができなかった。

b. iPS由来心筋細胞を用いたスクリーニング系の開発

心筋症患者から樹立されたiPS細胞から分化誘導した心筋細胞の異常な表現型を検出可能な解析系をもとに、S/N比が大きく再現性の高いスクリーニング系を確立し、製薬企業2企業とスクリーニング系の開発および以降の創薬スクリーニングの優先実施に関する共同研究契約を締結した。収縮・拡張様式に関する解析系からスクリーニング系の確立を目指したが、誤差が大きかったために確立することができなかった。

⑤ 心筋症の革新的な治療法開発

秘密保持契約を締結した製薬企業各社に対して④b. で確立したスクリーニング系についてプレゼンテーションを行い、心筋症治療薬開発に関心を示す製薬企業を募った結果、国内製

薬企業2企業と共同で心筋症に対する治療薬開発を実施するための共同研究契約を締結した。現在スクリーニング系の fine-tuning を実施するとともに技術移管のための準備作業を進めている。

D. 考察

● 心筋症患者のゲノム解析

全国に多くの心筋症患者が存在するが、戦略的なゲノム解析は実施されておらず、ゲノム変異が明らかとなっても、適切な治療法の選択に影響を与えるようなエビデンスが存在しなかった。その要因の一つとして心筋症には変異の報告のある対象遺伝子が多く、臨床医が解析対象遺伝子を容易に選択できなかつたことが挙げられる。

本研究で実施している既知遺伝子に対するターゲットリシーケンスは、1回の実験で複数患者から採取したゲノムについて同時に95遺伝子の変異解析を行うことが可能であり、解析対象遺伝子の選択に悩まされることが少なくなる。対象遺伝子を任意に変更することも可能であり、柔軟性も高い。ターゲットリシーケンス手法を確立し、解析を容易に実施可能なパイプラインを構築することで、一般の臨床医によるゲノム解析に対するハードルを下げることができると考えられる。

● 心筋症患者の iPS 由来心筋細胞解析

我々が独自に開発した培養液および低分子化合物を用いた心筋細胞への分化誘導系は、組成が明らかな成分のみを利用しているため、再現性高く iPS 細胞を分化誘導することが可能であり、また三次元培養を利用しているため、将来的に化合物スクリーニングに利用するために十分量の心筋細胞をえることができる点で優れている。我々が開発した心筋細胞への分化誘導系を利用することで、多くの iPS 細胞クローンを心筋細胞へと分化誘導できが、クローン毎に心筋細胞への分化効率は異なっており、病態解明に利用するクローンを吟味するとともに、化合物濃度や 3D 培養条件を微調整することでより効率よく心筋細胞を誘導し、研究に利用することが有用であると考えられた

ハイコンテツ解析系を用いて統計学的

に有意差を認める疾患特異的な表現型をいくつか同定することができた。特に疾患表現型が強く出現するクローンを選定することで、S/N 比の高い、高品質なスクリーニング系を構築することができると考えられる。また、肥大型心筋症の疑診例から iPS 細胞を作成し、疾患特異的な表現型出現の有無を指標とした診断技術へと応用することができると考えられた。

生理的表現型を用いた解析を試みたものの、十分な再現性と S/N 比を有する解析系を構築することができなかつた。単一細胞を解析する場合には心筋細胞間のばらつきを小さくするための工夫（パターン化した基質への播種など）、シート状細胞を解析する場合には十分に細胞を単細胞まで単離し培養基材状で偏りが生じないようにする工夫が必要であると考えられた。

● 心筋症の革新的な治療法開発

心筋症患者の iPS 由来心筋細胞解析を通じて得られた知見をもとに、心筋症の革新的な治療法開発のためのスクリーニング系を構築した。心筋症において症状が出現するのは心室であることから、ハイコンテツ解析を行う際には心室型ミオシン軽鎖で免疫染色を行って心室筋を選別して解析することでより正確で S/N 比の大きな評価が可能になると考えられた。スクリーニングに利用する培養基質や播種する心筋細胞の播種密度を最適化することで、安定して肥大型心筋症 iPS 由来心筋細胞の疾患特異的な表現型を確認することができるスクリーニング系を構築できた。

構築したスクリーニング系について複数 iPS 細胞を利用したバリデーションを行い、肥大型心筋症 iPS 由来心筋細胞に共通して有意な変化が認められるパラメータを得ることができ、疾患表現型が強く出現するクローンを選定することで、S/N 比の高い、高品質なスクリーニング系を構築できると考えられた。さらに、構築したスクリーニング系を用いて市販ライブラリーのスクリーニングを行ったところ、発症年齢が乳児期の症例と成人の症例では、細胞レベルの異常を修正する効果が認められる化合物のパターンが異なっていたことから、発症年齢が乳児期の特殊な症例では疾患表

現型が比較的明瞭に出現するものの、より一般的な症例から樹立した iPS 細胞をスクリーニングに利用することでより多くの患者に対して治療効果を期待できる化合物を同定できる可能性が示された。

E. 結論

心筋症のゲノム解析パイプラインを構築し、既知変異遺伝子のターゲットリシーケンス法を確立した。また、心筋症患者から樹立した iPS 細胞を解析することで疾患特異的に出現する表現型を同定し、疾患表現型を指標としたスクリーニング系を構築した。ゲノムに関しては対象症例を拡大して引き続き解析することで、日本の心筋症におけるゲノム変異情報を蓄積し、さらなる疾患概念の構築、早期診断、良い治療法の開発へと繋げていく必要がある。iPS 細胞に関しては引き続き対象症例を蓄積するとともに、製薬企業と共同での創薬研究を推進していくことが重要である。また、ゲノム解析から得られた情報と iPS 細胞から得られた情報、さらに臨床現場から得られた情報を統合することで、心筋症患者の治療に現実的に貢献できる研究を進めていくことが重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsuoka K, Asano Y, Higo S, Tsukamoto O, Yan Y, Yamazaki S, Matsuzaki T, Kioka H, Kato H, Uno Y, Asakura M, Asanuma H, Minamino T, Aburatani H, Kitakaze M, Komuro I, Takashima S. Noninvasive and quantitative live imaging reveals a potential stress-responsive enhancer in the failing heart. *FASEB J*. 2014
2. Akazawa H, Komuro I. Dickkopf-3: a stubborn protector of cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* 102:6-8, 2014. Apr;28(4):1870-9.
3. Wang S, Gong H, Jiang G, Ye Y, Wu J, You J, Zhang G, Sun A, Komuro I, Ge J, Zou Y. Src is required for mechanical stretch-induced cardiomyocyte hypertrophy through angiotensin II type 1 receptor-dependent β -arrestin2 pathways. *PLoS One* 9:e92926, 2014.
4. Kakiuchi M, Nishizawa T, Ueda H, Gotoh K, Tanaka A, Hayashi A, Yamamoto S, Tatsuno K, Katoh H, Watanabe Y, Ichimura T, Ushiku T, Funahashi S,

Tateishi K, Wada I, Shimizu N, Nomura S, Koike K, Seto Y, Fukayama M, Aburatani H, Ishikawa S. Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. *Nat Genet*. 2014 Jun;46(6):583-7.

5. Gong H, Yan Y, Fang B, Xue Y, Yin P, Li L, Zhang G, Sun X, Chen Z, Ma H, Yang C, Ding Y, Yong Y, Zhu Y, Yang H, Komuro I, Ge J, Zou Y. Knockdown of nucleosome assembly protein 1-like 1 induces mesoderm formation and cardiomyogenesis via notch signaling in murine-induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2014 Jul;32(7):1759-73.
6. Hara M, Sakata Y, Nakatani D, Suna S, Usami M, Matsumoto S, Sugitani T, Nishino M, Sato H, Kitamura T, Nanto S, Hamasaki T, Hori M, Komuro I; OACIS Investigators. Comparison of 5-year survival after acute myocardial infarction using angiotensin-converting enzyme inhibitor versus angiotensin II receptor blocker. *Am J Cardiol* 114:1-8, 2014.
7. Arita Y, Nakaoka Y, Matsunaga T, Kidoya H, Yamamizu K, Arima Y, Kataoka-Hashimoto T, Ikeoka K, Yasui T, Masaki T, Yamamoto K, Higuchi K, Park JS, Shirai M, Nishiyama K, Yamagishi H, Otsu K, Kurihara H, Minami T, Yamauchi-Takahara K, Koh GY, Mochizuki N, Takakura N, Sakata Y, Yamashita JK, Komuro I. Myocardium-derived angiopoietin-1 is essential for coronary vein formation in the developing heart. *Nat Commun* 5:4552, 2014.
8. Kudo-Sakamoto Y, Akazawa H, Ito K, Takano J, Yano M, Yabumoto C, Naito AT, Oka T, Lee JK, Sakata Y, Suzuki J, Saido TC, Komuro I. (2014). Calpain-dependent cleavage of N-cadherin is involved in the progression of post-myocardial infarction remodeling. *J Biol Chem*. 289(28):19408-19.
9. Hara M, Sakata Y, Nakatani D, Suna S, Usami M, Matsumoto S, Ozaki K, Nishino M, Sato H, Kitamura T, Nanto S, Hamasaki T, Tanaka T, Hori M, Komuro I; OACIS Investigators. Reduced risk of recurrent myocardial infarction in homozygous carriers of the chromosome 9p21 rs1333049 C risk allele in the contemporary percutaneous coronary intervention era: a prospective

- observational study. *BMJ Open* 4: e005438, 2014.
10. Morita H, Komuro I. The metabolic syndrome and DYRK1B. *N Engl J Med.* 2014 Aug 21;371(8):785.
 11. Yasui H, Lee JK, Yoshida A, Yokoyama T, Nakanishi H, Miwa K, Naito AT, Oka T, Akazawa H, Nakai J, Miyagawa S, Sawa Y, Sakata Y, Komuro I. (2014). Excitation propagation in three-dimensional engineered hearts using decellularized extracellular matrix. *Biomaterials.* 35(27):7839-50. Imamura T, Kinugawa K, Fujino T, Inaba T, Maki H, Hatano M, Yao A, Komuro I. Increased Urine Aquaporin-2 Relative to Plasma Arginine Vasopressin Is a Novel Marker of Response to Tolvaptan in Patients With Decompensated Heart Failure. *Circ J* 78:2240-2249, 2014.
 12. Sun A, Zou Y, Wang P, Xu D, Gong H, Wang S, Qin Y, Zhang P, Chen Y, Harada M, Isse T, Kawamoto T, Fan H, Yang P, Akazawa H, Nagai T, Takano H, Ping P, Komuro I, Ge J. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 plays protective roles in heart failure after myocardial infarction via suppression of the cytosolic JNK/p53 pathway in mice. *J Am Heart Assoc.* 2014 Sep 18;3(5):e000779.
 13. Oguri G, Nakajima T, Yamamoto Y, Takano N, Tanaka T, Kikuchi H, Morita T, Nakamura F, Yamasoba T, Komuro I. Effects of methylglyoxal on human cardiac fibroblast: Roles of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 307:H1339-H1352, 2014.
 14. Morita H, Komuro I. Somatic mutations in cerebral cortical malformations. *N Engl J Med.* 2014 Nov 20;371(21):2037.
 15. Liu ML, Nagai T, Tokunaga M, Iwanaga K, Matsuura K, Takahashi T, Kanda M, Kondo N, Naito AT, Komuro I, Kobayashi Y. (2014). Anti-inflammatory peptides from cardiac progenitors ameliorate dysfunction after myocardial infarction. *J Am Heart Assoc.* 3(6):e001101.
 16. Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, Tsuji S, Donehower LA, Slagle BL, Nakamura H, Yamamoto S, Shinbrot E, Hama N, Lehmkuhl M, Hosoda F, Arai Y, Walker K, Dahdouli M, Gotoh K, Nagae G, Gingras MC, Muzny DM, Ojima H, Shimada K, Midorikawa Y, Goss JA, Cotton R, Hayashi A, Shibahara J, Ishikawa S, Guiteau J, Tanaka M, Urushidate T, Ohashi S, Okada N, Doddapaneni H, Wang M, Zhu Y, Dinh H, Okusaka T, Kokudo N, Kosuge T, Takayama T, Fukayama M, Gibbs RA, Wheeler DA, Aburatani H, Shibata T. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet.* 2014 Dec;46(12):1267-73.
 17. Hayashi T, Asano Y, Shintani Y, Aoyama H, Kioka H, Tsukamoto O, Hikita M, Shinzawa-Itoh K, Takafuji K, Higo S, Kato H, Yamazaki S, Matsuoka K, Nakano A, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Goto Y, Ogura T, Kitakaze M, Komuro I, Sakata Y, Tsukihara T, Yoshikawa S, Takashima S. Higd1a is a positive regulator of cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:1553-1558, 2015.
 18. Sumida T, Naito AT, Nomura S, Nakagawa A, Higo T, Hashimoto A, Okada K, Sakai T, Ito M, Yamaguchi T, Oka T, Akazawa H, Lee JK, Minamino T, Offermanns S, Noda T, Botto M, Kobayashi Y, Morita H, Manabe I, Nagai T, Shiojima I, Komuro I. (2015) Complement C1q-induced activation of β -catenin signalling causes hypertensive arterial remodelling. *Nat Commun.* 6:6241. doi: 10.1038/ncomms7241.
 19. Nakayama A, Morita H, Hamamatsu A, Miyata T, Hoshina K, Nagayama M, Takanashi S, Sumiyoshi T, Komuro I. Coronary atherosclerotic lesions in patients with ruptured abdominal aortic aneurysm. *Heart Vessels.* 2014 Mar 7. [Epub ahead of print]
 20. Flex E, Jaiswal M, Pantaleoni F, Martinelli S, Strullu M, Fansa EK, Caye A, De Luca A, Lepri F, Dvorsky R, Pannone L, Paolacci S, Zhang SC, Fodale V, Bocchinfuso G, Rossi C, Burkitt-Wright EM, Farrotti A, Stellacci E, Cecchetti S, Ferese R, Bottero L, Castro S, Fenneteau O, Brethon B, Sanchez M, Roberts AE, Yntema HG, van der Burgt I, Cianci P, Bondeson ML, Digilio MC, Zampino G, Kerr B, Aoki Y, Loh ML, Palleschi A, Di

- Schiavi E, Carè A, Selicorni A, Dallapiccola B, Cirstea IC, Stella L, Zenker M, Gelb BD, Cavé H, Ahmadian MR, Tartaglia M. Activating mutations in RAS underlie a phenotype within the RASopathy spectrum and contribute to leukaemogenesis. *Hum Mol Genet.* 23:4315-27, 2014
21. Sasaki H, Nagayama T, Blanton RM, Seo K, Zhang M, Zhu G, Lee DI, Bedja D, Hsu S, Tsukamoto O, Takashima S, Kitakaze M, Mendelsohn ME, Karas RH, Kass DA, Takimoto E: PDE5 inhibitor efficacy is estrogen dependent in female heart disease. *J Clin Invest.*2014; 124:2464-2471
 22. Chen BH, Lu D, Fu YJ, Zhang JW, Huang XB, Cao SP, Xu DL, Bin JP, Kitakaze M, Huang QB, Liao YL: Olmesartan prevents cardiac rupture in mice with myocardial infarction by modulating growth differentiation factor 15 and p53. *British Journal of Pharmacology* 2014; 171:3741-3753
 23. Zeng Z, Shen L, Li XX, Luo T, Wei X, Zhang JW, Cao SP, Huang XB, Fukushima Y, Bin JP, Kitakaze M, Xu DL, Liao YL: Disruption of histamine H-2 receptor slows heart failure progression through reducing myocardial apoptosis and fibrosis. *Clinical Science* 2014; 127:435-448
 24. Imazu M, Takahama H, Asanuma H, Funada A, Sugano Y, Ohara T, Hasegawa T, Asakura M, Kanzaki H, Anzai T, Kitakaze M: Pathophysiological impact of serum fibroblast growth factor 23 in patients with nonischemic cardiac disease and early chronic kidney disease. *AJP-Heart Circ Physiol* 2014; 307:H1504-H1511
 25. Hirokawa M, Morita H, Tajima T, Takahashi A, Ashikawa K, Miya F, Shigemizu D, Ozaki K, Sakata Y, Nakatani D, Suna S, Imai Y, Tanaka T, Tsunoda T, Matsuda K, Kadowaki T, Nakamura Y, Nagai R, Komuro I, Kubo M. A genome-wide association study identifies PLCL2 and AP3D1-DOT1L-SF3A2 as new susceptibility loci for myocardial infarction in Japanese. *Eur J Hum Genet.* 2015 Mar;23(3):374-80.
 26. Yan Y, Tsukamoto O, Nakano A, Kato H, Kioka H, Ito N, Higo S, Yamazaki S, Shintani Y, Matsuoka K, Liao Y, Asanuma H, Asakura M, Takafuji K, Minamino T, Asano Y, Kitakaze M, Takashima S. Augmented AMPK activity inhibits cell migration by phosphorylating the novel substrate Pdlim5. *Nature communications* 2015;6:6137
2. 学会発表
学会発表
国内学会
 1. 小室一成：心不全の新しい治療、日本麻酔科学会第 61 回学術集会（2014, 5, 神奈川）
 2. 油谷浩幸： Cooperative epigenomic switch during cardiomyocyte differentiation、国立遺伝学研究所研究会（2014, 6, 三島）
 3. 内藤篤彦：iPS 細胞を用いた循環器疾患に対する創薬、For the Better Forum 2014（2014, 9, 東京）
 4. 内藤篤彦：Drug Discovery Against Heart Failure using Human iPS cells.、第 18 回日本心不全学会学術集会（2014, 10, 大阪）
 5. 岡田佳築、内藤篤彦、塩島一朗、坂田泰史、小室一成：Wnt/ β -catenin Signaling Promotes Heart Failure-Induced Skeletal Myopathy through Direct Interaction with FoxO.、第 18 回日本心不全学会学術集会（2014, 10, 大阪）
 6. Asakura M, Asanuma H, Ito S, Min KD, Seguchi O, Nishigori M, Nakatani T, Tomonaga T, Minamino N, Kitakaze M: 心不全の病態解明を目指した不全心筋サンプルを用いた観察研究、第 18 回日本心不全学会学術集会（2014, 10, 大阪）
 7. Sindow K, Asakura M, Min KD, Imazu M, Fukuda H, Kitakaze M: 圧負荷心不全モデルマウスにおける腎臓の遺伝子変化、第 18 回日本心不全学会学術集会（2014, 10, 大阪）
 8. 内藤篤彦：Wnt シグナルと心臓の生老病死、第 66 回日本皮膚科学会西部支部学術集会（2014, 11, 高松）
 9. Aoki Y, Niihori T, Inoue SI and Matsubara Y 「Molecular analysis of RASopathies using next generation

sequencer] The 14 th East Asian Union of Human Genetics (EAUHGS) Annual Meeting. (2014, 11, 東京)

- 10.内藤篤彦: Wnt シグナルと心臓の生老病死、脳心血管抗加齢研究会 2014 (2014, 12, 大阪)

国際学会

1. Issei Komuro: Angiogenic therapy for heart failure. China-Japan Conference (2014, 4, Kyoto)
2. Akito Nakagawa, Atsuhiko Naito, Tomokazu Sumida, Seitaro Nomura, Masato Shibamoto, Tomoaki Higo, Katsuki Okada, and Issei Komuro: Activation of canonical Wnt signaling in arterial endothelial cell induces cardiac dysfunction. The 18th International Vascular Biology Meeting (2014, 4, Kyoto)
3. Issei Komuro: PI3 Kinase signaling and heart failure. Heart Failure 2014 “The Inflammasome more burning problems” (2014, 5, Greece)
4. Issei Komuro: Stem cells & cardiac regeneration. The 8th OCC 2014 (2014, 5, China)
5. Tomoaki Higo, Atsuhiko Naito, Yasushi Sakata, and Issei Komuro: Pathogenic role of DNA single strand break accumulation in heart failure. Basic Cardiovascular Sciences Scientific Sessions (2014, 7, Las Vegas)
6. Issei Komuro: Molecular Mechanisms of Heart Failure. The 12th China Congress of ISHR (2014, 8, China)
7. Ito S, Asakura M, Min KD, Imazu M, Shindo K, Asanuma H, Kitakaze M: Mtus1 splice variant inhibits cardiac hypertrophy and exacerbates heart failure. ESC Congress 2014 (2014, 8, Spain)
8. Min KD, Asakura M, Ito S, Imazu M, Shindo K, Asanuma H, Kitakaze M: Pressure overload to the heart induces pulmonary up-regulation of genes coding secretory proteins involved in the cardiovascular diseases. ESC Congress 2014 (2014, 8, Spain)
9. Hiroyuki Aburatani: Cooperative epigenomic switch during cardiomyocyte differentiation. Cold Spring Harbor Asia Conference on Systems Biology of gene regulation & genome editing 2014, 9, China)
10. Issei Komuro: Myocardial Natriuretic Peptide Signaling In Heart Failure: Basic Insights 2014 HFSA Annual Scientific Meeting (2014, 9, Las Vegas)
11. Yuki Kuramoto, Masamichi Ito, and Atsuhiko Naito: Non-genetic method for purification of ventricular cells from human iPS-derived cardiomyocytes. Safety Pharmacology Society Annual Meeting (2014, 10, Washington DC)
12. Masamichi Ito, Yuki Kuramoto, and Atsuhiko Naito: Scalable, reproducible, and economical method for producing cardiomyocytes from human iPS cells. Safety Pharmacology Society Annual Meeting (2014, 10, Washington DC)
13. Issei Komuro: Molecular mechanisms of heart failure- Angiogenesis and aging 3rd International Conference on Cardiovascular Science (2014, 10, China)
14. Masamichi Ito, Ryoko Takizawa, Natsumi Igarashi, Megumi Naito, Issei Komuro, and Atsuhiko Naito: Scalable, reproducible, and economical method for producing cardiomyocytes from human iPS cells. American Heart Association Scientific Sessions 2014 (2014, 11, Chicago)
15. Min KD, Asakura M, Ito S, Imazu M, Shindo K, Kitakaze M: Temporal and quantitative regulation of Smad9 by its wpecific ligase Asb2 is required for cardiac development through the induction of Tbx2 expression by BMP2 stimulation. American Heart Association Scientific Sessions 2014 (2014, 11, Chicago)
16. Imazu M, Asakura M, Hasegawa T, Asanuma H, Ito S, Nakano A, Funada A, Sugano Y, Ohara T, Kanzaki H, Takahama H, Morita T, Anzai T, Kitakaze M: Effects of the oral adsorbent of AST-120 in patients with both chronic heart failue and chronic kidney disease. American Heart Association Scientific Sessions 2014 (2014, 11, Chicago)
17. Hiroyuki Aburatani: Coordinated chromatin regulation by developmental signals during cardiomyocyte differentiation Joint symposium on TGF-b family and cancer (2015, 1, Tsukuba)
18. Lee J, Yasui H, Yokoyama T, Nakanishi H, Yoshida A, Miwa K, Nakai J, Miyagawa S, Sawa Y, Sakata Y,

Komuro I: Electrical properties of threedimensional engineered hearts using decellularized extracellular matrix. Gordon Research Conference: Cardiac Arrhythmia Mechanisms (The Surprising Heart: A Hetero-Cellular, Multi-Physics, and Inter-Disciplinary Challenge) (2015, 3, Italy)

G. 知的財産権の出願・登録状況

特許

1.

出願日：2014年9月2日

出願番号：特願2014-178285

発明の名称：多能性幹細胞から心筋細胞を分化誘導する方法、並びに該方法に好適な培地添加剤、分化誘導調節剤、培地、培地作製用キット、及び多能性幹細胞から心筋細胞を分化誘導するためのキット

発明者：内藤篤彦

2.

出願日：2014年10月9日

出願番号：特願2014-208147

発明の名称：心筋細胞の製造方法、心室型心筋細胞及びその製造方法、並びにスクリーニング方法

発明者：内藤篤彦、小室一成

厚生労働科学研究委託費(難治性疾患実用化研究事業)
委託業務成果報告(業務項目)

心筋症患者のゲノム解析

担当責任者 油谷 浩幸 東京大学先端科学技術研究センター 教授

研究要旨：

我々は心筋症患者のゲノム解析パイプラインを構築し、実際のゲノム解析に着手した。アジレント社の Haloplex のプラットフォームを用いて独自の心筋症パネルを作成し、東京大学医学部附属病院にて収集された 23 症例の心筋症患者から抽出したゲノム DNA を用いて心筋症関連 95 遺伝子のターゲットシーケンスを行い、レファレンス配列に対して 549 ヶ所の変異を同定した。さらに日本人の SNPs データベースを用いて、81 の疾患との関係が示唆される変異を同定し、MYH7、SCN5A などの遺伝子座に疾患特異的な変異が濃縮していることが明らかとなった。さらに 24 例の検体に対してエクソーム解析を行うことにより、両解析手法の妥当性を確認するとともに、既知遺伝子座以外の新規変異遺伝子の同定に向けて解析を進めた。このように心筋症患者のゲノム解析を通して、遺伝子変異と細胞機能の関連について、より深い理解を得ることが期待される。

キーワード：心筋症 ゲノム解析 既知変異遺伝子スクリーニング

A. 研究目的

心筋症患者のゲノムで認められる遺伝子変異の種類および頻度を解明し、心筋症患者から樹立された iPS 細胞由来心筋細胞の表現型解析を通じて心筋症の病態を解明することを目的とする。

B. 研究方法

心筋症患者の血液から採取したゲノム DNA を用いて既知遺伝子のスクリーニングを行う。アジレント社 Haloplex のプラットフォームを用いた心筋症関連の 95 遺伝子のエクソン領域を 99.43%カバーする心筋症パネルを作成し、アジレント社の自動化システム Bravo を使ってターゲット領域のエンリッチメントを均一に行い、次世代シーケンサー(イルミナ社 HiSeq2500)を用いて、既知遺伝子のターゲットリシーケンスを行った。解析は、アジレント社が提供する Haloplex 専用解析ツールである SureCall を用いて 23 症例に対して解析を行った。また一部の症例においてシーケンス委託により、エクソーム解析を行った。

C. 研究結果

各検体の塩基配列情報をヒトゲノム配列情報 (UCSC human genome 19) をレファレンスとして解析し、23 症例において 549 の変異を同定した。既知の SNPs を日本人の含めた SNP データベースを用いて除去したところ、81 の変異が同定された。この解析により、MYH7、SCN5A などの遺伝子座に疾患特異的な変異が濃縮していることが分かった。今後変異部位の配列をサンガー法で確認するとともに、検体を拡大して解析を継続し、患者の臨床情報、iPS 細胞由来心筋細胞の表現型と統合解析を行う。

また平成 26 年度は 24 症例のエクソームシーケンスを行った。Haloplex 法で同定していた既知遺伝子領域における変異が同様に確認され、両者の解析手法の妥当性を確認するものとなった。現在、新規変異遺伝子の同定に向けて、既知遺伝子以外の部位についても解析中である。こちらも合わせて、新たに同定された変異をサンガー法で確認するとともに、検体を拡大して解析を継続していく。

D. 考察

心筋症は全国に多くの患者が存在するに

も関わらず、これまでほとんどゲノム解析の対象となっていなかった。その原因として、ゲノム変異が明らかとなっても、治療法の選択に影響を与えるようなエビデンスが存在しないこと、心筋症には変異の報告のある対象遺伝子が多く、臨床医が解析対象遺伝子を容易に選択できなかつたことが考えられる。

本事業で行っている既知遺伝子に対するターゲットリシーケンスは、1回の実験で複数患者のサンプルを用いて複数遺伝子の変異解析を行うことが可能であり、解析対象遺伝子の選択に悩まされることが少ない。対象遺伝子を変更することも可能であり、柔軟性が高いことも利点である。このターゲットリシーケンスの確立及び発展が、一般の臨床現場におけるゲノム情報の活用を推進するのに大きく貢献すると考えられる。

しかし既知遺伝子のみには解析対象を絞ったとしても、様々な variant が出てきて、真の原因変異であるか否かを決定することは極めて難しい。SNPs や rare variant を厳しく考慮し、variant がもたらす機能変化を予測するとともに、可能な限り家系解析に持ち込めるようサンプリングすることも重要であろう。本事業で行っているように、患者由来 iPS 細胞から作成した心筋細胞を用いた機能解析や、CRISPR/Cas9 システムなどゲノム編集を行うことで、同定されたゲノム変異がいかに細胞機能に影響を与えているかを検討していく必要がある。

さらにゲノム解析情報をどのように臨床情報と統合していくかも重要な点である。解析対象とする日本人患者の臨床情報データベースが整備されることにより、ゲノム解析情報の意義が大きくなる。患者臨床情報は匿名化により、個人を特定できないよう留意する一方、今後臨床情報データベースを統合するチームとの協力、もしくは本事業に特化したデータベースの構築も進めていくことが望ましい。

E. 結論

我々は心筋症のゲノム解析パイプラインを構築し、心筋症関連 95 遺伝子のターゲットリシーケンスを行い、MYH7、SCN5A

などの遺伝子座に疾患特異的な変異が濃縮していることを明らかにした。今後対象症例を拡大して引き続き解析し、臨床情報および iPS 細胞由来心筋細胞の表現型と統合解析することで、心筋症の発症機序解明、治療法開発へと繋げていく。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, Tsuji S, Donehower LA, Slagle BL, Nakamura H, Yamamoto S, Shinbrot E, Hama N, Lehmkuhl M, Hosoda F, Arai Y, Walker K, Dahdouli M, Gotoh K, Nagae G, Gingras MC, Muzny DM, Ojima H, Shimada K, Midorikawa Y, Goss JA, Cotton R, Hayashi A, Shibahara J, Ishikawa S, Guiteau J, Tanaka M, Urushidate T, Ohashi S, Okada N, Doddapaneni H, Wang M, Zhu Y, Dinh H, Okusaka T, Kokudo N, Kosuge T, Takayama T, Fukayama M, Gibbs RA, Wheeler DA, Aburatani H, Shibata T. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet.* 2014 Dec;46(12):1267-73.

2) Kakiuchi M, Nishizawa T, Ueda H, Gotoh K, Tanaka A, Hayashi A, Yamamoto S, Tatsuno K, Katoh H, Watanabe Y, Ichimura T, Ushiku T, Funahashi S, Tateishi K, Wada I, Shimizu N, Nomura S, Koike K, Seto Y, Fukayama M, Aburatani H, Ishikawa S. Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. *Nat Genet.* 2014 Jun;46(6):583-7.

2. 学会発表

1. 油谷浩幸：Cooperative epigenomic switch during cardiomyocyte differentiation、国立遺伝学研究所研究会(2014, 6, 三島)
2. Hiroyuki Aburatani: Cooperative epigenomic switch during

cardiomyocyte differentiation. Cold Spring Harbor Asia Conference on Systems Biology of gene regulation & genome editing (2014, 9, China)

3. Hiroyuki Aburatani: Coordinated chromatin regulation by developmental signals during cardiomyocyte differentiation. Joint symposium on TGF- β family and cancer (2015, 1, Tsukuba)

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生労働科学研究委託費(難治性疾患実用化研究事業)
委託業務成果報告(業務項目)

心筋症患者のiPS由来心筋細胞解析

担当責任者 李 鍾國 大阪大学大学院医学系研究科 寄附講座准教授

研究要旨：

心筋症の病態解明を妨げる最大の要因は、心筋症患者の心臓から心筋細胞を分離し、生きたまま培養して様々な解析を行うことができないことである。心筋症患者から iPS 細胞を樹立し、そこから分化誘導した心筋細胞を解析することで、心筋症患者と同じゲノム変異をもつ心筋細胞の解析が可能になり、病態解明へとつながるものと期待される。我々は組成が明らかな成分を利用した独自の分化誘導培地と低分子化合物のみを利用したプロトコルを開発し、従来の 1/5 以下のコストで心筋細胞を分化誘導するシステムを構築している。健常者 4 名、肥大型心筋症患者 5 名、拡張型心筋症患者 6 名から文部科学省「疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究」で樹立された iPS 細胞 2 クローンを心筋細胞へと分化誘導し、ハイコンテツ解析系およびイメージング技術を用いて表現型を解析した。ハイコンテツ解析系で肥大型心筋症 iPS 由来心筋細胞に特異的に出現する形態の異常や、拡張型心筋症 iPS 由来心筋細胞に負荷を加えることで発現に変化を認めるタンパクを同定しており、それらを指標とした創薬スクリーニング系を作成したり、肥大型心筋症診断法へと応用したりできる可能性が示された。

キーワード：ヒト iPS 細胞 心筋細胞 ハイコンテツ解析 イメージング

業務分担者

東京大学医学部附属病院・特任助教

内藤 篤彦

A. 研究目的

心筋症は心機能障害を伴う心筋疾患と定義されている難治性疾患である。ゲノム異常が原因で心筋細胞に起こる異常のために発症することが推測されているが、その病態については不明な点が多く、病態に根ざした治療薬の開発は進んでいない。

心筋症の病態解明を妨げる最大の要因は、心筋症患者の心臓から心筋細胞を分離し、生きたまま培養して様々な解析を行うことができないことである。心筋症患者から iPS 細胞を樹立し、そこから分化誘導した心筋細胞を解析することで、心筋症患者と同じゲノム変異をもつ心筋細胞の解析が可能になり、病態解明へとつながるものと期待される。

本研究の目的は、文部科学省「疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究」で心筋症患者か

ら樹立された iPS 細胞から心筋細胞を分化誘導し、形態・生理機能に関する基本的なデータを採取するとともに、心筋症患者から樹立された iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞に特異的に出現する異常な表現型（疾患表現型）をスループレットネス高く検出可能な構築系を作成し、S/N 比の大きく再現性の高いスクリーニング系を開発することである。

B. 研究方法

● iPS 細胞の培養

文部科学省「疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究」で心筋症患者から樹立された iPS 細胞、健常ボランティアから樹立された iPS 細胞は定法に則ってフィーダー細胞上で培養した。

● iPS 細胞の心筋細胞への分化誘導

我々が独自に開発した培養液および低分子化合物を利用した再現性の高い技術を利用して心筋細胞への分化誘導を行っ

た。簡潔に要約すると、決められた密度で浮遊培養することで胚様体を形成させた後、決められた 5 種類の低分子化合物を作用させることで心筋細胞を分化誘導した。胚様体を分離した後にグルコースを含まない培養液中で培養し、非心筋細胞の成長を抑制することで心筋細胞を精製した。

- ハイコンテツ解析系を用いた形態評価
分化誘導した心筋細胞を CellCarrier 96 (Perkin Elmer 社)に播種し、一定期間培養後、免疫染色を行い形態および各種タンパクの発現を解析した。撮像および定量解析には Perkin Elmer 社「Operetta」を利用し実験者のバイアスが入らないよう留意した。
- イメージング技術を用いた収縮・拡張評価
分化誘導した心筋細胞を 24 well plate もしくは 96 well plate に播種し、一定期間培養後 SONY 社 Cell Motion Imager を用いて収縮・拡張様式の解析を行った。

C. 研究結果

- 肥大型心筋症患者の iPS 由来心筋細胞解析
健康ボランティア 1 名、健康血縁者 1 名、肥大型心筋症患者 5 名から樹立した iPS 細胞をそれぞれ 2 クローンずつ選択し、計 14 クローンを、全く同一のプロトコル・スケジュールで 3 回以上分化誘導～解析を行った。
ハイコンテツ解析機器を用いた形態評価では肥大型心筋症患者から樹立した iPS 細胞を分化誘導した心筋細胞特異的に出現するパラメータがいくつか存在することが明らかになった。また、そのパラメータが「iPS 細胞を利用した肥大型心筋症診断法」に応用可能か検討したところ、陽性的中率は 0.88 と従来の肥大型心筋症と同様かそれ以上に高い値を示した。
イメージング技術を用いた収縮・拡張評価では、分化誘導のバッチ間差や well 間差、well 内の場所間差が大きく、肥大型心筋症特異的な表現型を解明するためには不適であることが示唆された。
- 拡張型心筋症患者の iPS 由来心筋細胞解析

健康ボランティア 2 名、拡張型心筋症患者 6 から樹立した iPS 細胞をそれぞれ 1 クローンずつ選択し、計 8 クローンを、全く同一のプロトコル・スケジュールで 3 回以上分化誘導～解析を行った。

ハイコンテツ解析機器を用いた形態評価では拡張型心筋症患者から樹立した iPS 細胞を分化誘導した心筋細胞に負荷をかけた際に心筋細胞のホメオスタシス維持に重要な役割をはたすタンパクが拡張型心筋症患者 iPS 細胞では低下することが明らかになった。

イメージング技術を用いた収縮・拡張評価でも、負荷をかけた状態での収縮・拡張様式の変化に焦点をあてて解析を行っている。

D. 考察

● 心筋細胞分化誘導技術

我々が独自に開発した培養液および低分子化合物を用いた心筋細胞への分化誘導系は、組成が明らかな成分のみを利用しているため、再現性高く iPS 細胞を分化誘導することが可能であり、また三次元培養を利用しているため、将来的に化合物スクリーニングに利用するために十分量の心筋細胞をえることができる点で優れている。我々が開発した心筋細胞への分化誘導系を利用することで、多くの iPS 細胞クローンを心筋細胞へと分化誘導できることが確認されたが、クローン毎に心筋細胞への分化効率は大きく異なっていた。病態解明に利用するクローンに心筋細胞への分化効率がよいクローンを選定するとともに、化合物濃度や 3D 培養条件を微調整することでより効率よく心筋細胞を誘導し、研究に利用することが有用であると考えられた。

● 心筋細胞精製技術

慶應義塾大学および第一三共株式会社が開発したグルコースを含まない培養液中で培養することで非心筋細胞を除去する方法は、クローンによって効果が異なり、グルコースを含まない培養液に対して感受性の高い（非心筋細胞がすぐに死滅する）クローンや低い（非心筋細胞が長期間残存する）クローンが認められた。また、グルコースを含まない培養液中で培養することで、細胞の遺伝

子発現が大きく変化することを見出しており、疾患表現型に影響を与える可能性がある。心筋細胞を精製する技術としては、京都大学の山下らが報告した SIRPA/VCAM1 法などがあるが、我々の心筋細胞分化誘導系では非心筋細胞にも SIRPA/VCAM1 が多く発現しており、心筋細胞を精製することができなかつた。一方、我々の分化誘導技術で作成した心筋細胞は古典的な密度勾配遠心法で 95% 以上まで精製することが可能であったことから、次年度以降は密度勾配遠心法を用いて心筋細胞の精製効率をクローン間で揃えることで、代謝に影響を与えることなく正確に心筋症 iPS 由来心筋細胞の疾患表現型を解析することが可能であると考えられた。

● ハイコンテツ解析系を用いた形態評価

本年度の研究では、iPS 細胞から心筋細胞を分化誘導・精製する際の微調整が最終的な iPS 由来心筋細胞の表現型に影響を与える可能性を鑑みて、全クローンで同一のプロトコルを用いて解析を行ったが、非心筋細胞の混入率や非心筋細胞の増殖度が高いクローンではコンフルエンスに著しい偏りが生じたため、結果を解析できないサンプルが多数出現した。

一方、結果が解析可能なサンプルでは、統計学的に有意差を認める疾患特異的な表現型をいくつか同定することができた。特に疾患表現型が強くなる出現するクローンを選定することで、S/N 比の高い、高品質なスクリーニング系を構築することができると考えられる。また、肥大型心筋症の疑診例から iPS 細胞を作成し、疾患特異的な表現型出現の有無を指標とした診断技術へと応用することができると考えられる。

● イメージング技術を用いた収縮・拡張評価

イメージング技術を用いた収縮・拡張評価では肥大型心筋症、拡張型心筋症固有の変化を同定することができなかつた。肥大型心筋症に関しては、2014 年に慶應義塾大学が我々と同じ機器を利用して、肥大型心筋症患者 iPS 由来心筋細胞内の収縮ベクトルが均一でないことを示している。心筋細胞の形態は多様であり、恣意的に心筋細胞を選択する

ことである程度再現することはできたが、無作為に心筋細胞を選択した場合にはばらつきが大きく、有意差を認めなかつた。また、単一の心筋細胞でなく、シート状に播種した心筋細胞の場合は、視野内の複数地点での再現性や、well 間の再現性、心筋細胞分化誘導バッチ間の再現性が低く、疾患特異的な表現型の評価やスクリーニング系への応用は現時点では困難であった。単一細胞を解析する場合には心筋細胞間のばらつきを小さくするための工夫（パターン化した基質への播種など）、シート状細胞を解析する場合には十分に細胞を単細胞まで単離し培養基材状で偏りが生じないようにする工夫が必要であると考えられた。

E. 結論

複数家系から樹立した多数の iPS 細胞から、全く同一の条件で心筋細胞を分化誘導・精製し、解析することで、ドナーの個体間差、iPS 細胞のクローン間差、iPS 細胞由来心筋細胞のバッチ間差を超える疾患表現型が確かに存在することが明らかになった。疾患表現型出現のメカニズムを解明することで心筋症の病態を明らかにすることができると考えられた。

F. 研究発表

論文

1. Liu ML, Nagai T, Tokunaga M, Iwanaga K, Matsuura K, Takahashi T, Kanda M, Kondo N, Naito AT, Komuro I, Kobayashi Y. (2014). Anti-inflammatory peptides from cardiac progenitors ameliorate dysfunction after myocardial infarction. *J Am Heart Assoc.* 3(6):e001101.
2. Yasui H, Lee JK, Yoshida A, Yokoyama T, Nakanishi H, Miwa K, Naito AT, Oka T, Akazawa H, Nakai J, Miyagawa S, Sawa Y, Sakata Y, Komuro I. (2014). Excitation propagation in three-dimensional engineered hearts using decellularized extracellular matrix. *Biomaterials.* 35(27):7839-50.
3. Kudo-Sakamoto Y, Akazawa H, Ito K, Takano J, Yano M, Yabumoto C, Naito AT, Oka T, Lee JK, Sakata Y, Suzuki J, Saido TC, Komuro I. (2014). Calpain-dependent cleavage of N-cadherin is involved in the progression of post-myocardial infarction remodeling. *J Biol Chem.* 289(28):19408-19.

4. Sumida T, Naito AT, Nomura S, Nakagawa A, Higo T, Hashimoto A, Okada K, Sakai T, Ito M, Yamaguchi T, Oka T, Akazawa H, Lee JK, Minamino T, Offermanns S, Noda T, Botto M, Kobayashi Y, Morita H, Manabe I, Nagai T, Shiojima I, Komuro I. (2015) Complement C1q-induced activation of β -catenin signalling causes hypertensive arterial remodelling. *Nat Commun.* 6:6241. doi: 10.1038/ncomms7241.

学会発表

国内学会

11. 内藤篤彦：iPS 細胞を用いた循環器疾患に対する創薬、For the Better Forum 2014 (2014, 9, 東京)
12. 内藤篤彦：Drug Discovery Against Heart Failure using Human iPS cells.、第 18 回日本心不全学会学術集会 (2014, 10, 大阪)
13. 岡田佳築、内藤篤彦、塩島一朗、坂田泰史、小室一成：Wnt/ β -catenin Signaling Promotes Heart Failure-Induced Skeletal Myopathy through Direct Interaction with FoxO.、第 18 回日本心不全学会学術集会 (2014, 10, 大阪)
14. 内藤篤彦：Wnt シグナルと心臓の生老病死、第 66 回日本皮膚科学会西部支部学術集会 (2014, 11, 高松)
15. 内藤篤彦：Wnt シグナルと心臓の生老病死、脳心血管抗加齢研究会 2014 (2014, 12, 大阪)

国際学会

1. Akito Nakagawa, Atsuhiko Naito, Tomokazu Sumida, Seitaro Nomura, Masato Shibamoto, Tomoaki Higo, Katsuki Okada, and Issei Komuro: Activation of canonical Wnt signaling in arterial endothelial cell induces cardiac dysfunction. *The 18th International Vascular Biology Meeting* (2014, 4, Kyoto)
2. Tomoaki Higo, Atsuhiko Naito, Yasushi Sakata, and Issei Komuro: Pathogenic role of DNA single strand break accumulation in heart failure. *Basic Cardiovascular Sciences Scientific Sessions* (2014, 7, Las Vegas)
3. Yuki Kuramoto, Masamichi Ito, and Atsuhiko Naito: Non-genetic method for purification of ventricular cells from human iPS-derived cardiomyocytes. *Safety Pharmacology Society Annual Meeting* (2014, 10, Washington DC)
4. Masamichi Ito, Yuki Kuramoto, and

Atsuhiko Naito: Scalable, reproducible, and economical method for producing cardiomyocytes from human iPS cells. *Safety Pharmacology Society Annual Meeting* (2014, 10, Washington DC)

5. Masamichi Ito, Ryoko Takizawa, Natsumi Igarashi, Megumi Naito, Issei Komuro, and Atsuhiko Naito: Scalable, reproducible, and economical method for producing cardiomyocytes from human iPS cells. *American Heart Association Scientific Sessions 2014* (2014, 11, Chicago)
6. Lee J, Yasui H, Yokoyama T, Nakanishi H, Yoshida A, Miwa K, Nakai J, Miyagawa S, Sawa Y, Sakata Y, Komuro I: Electrical properties of three-dimensional engineered hearts using decellularized extracellular matrix. *Gordon Research Conference: Cardiac Arrhythmia Mechanisms (The Surprising Heart: A Hetero-Cellular, Multi-Physics, and Inter-Disciplinary Challenge)* (2015, 3, Italy)

G. 知的所有権の取得状況

特許

1.

出願日：2014年9月2日

出願番号：特願2014-178285

発明の名称：多能性幹細胞から心筋細胞を分化誘導する方法、並びに該方法に好適な培地添加剤、分化誘導調節剤、培地、培地作製用キット、及び多能性幹細胞から心筋細胞を分化誘導するためのキット

発明者：内藤篤彦

厚生労働科学研究委託費(難治性疾患実用化研究事業)
委託業務成果報告(業務項目)

心筋症に対する革新的な治療薬開発

担当責任者 内藤 篤彦 東京大学医学部附属病院 特任助教

研究要旨：

心筋症の原因は不明であり、心筋症に対する治療薬は存在しない。心筋症の病態解明を目的として遺伝子改変マウスを用いた研究が行われてきたが、種差による表現型の違いなどからドラッグブルな標的分子の同定には至っていない。心筋症患者から iPS 細胞を樹立し、そこから分化誘導した心筋細胞は患者の心臓で認められる異常と同様の異常が出現する可能性があり、そのような疾患特異的な異常を指標とした創薬スクリーニング系を開発し、ライブラリースクリーニングを行うことで、画期的な新薬を開発できる可能性がある。本年度、我々は肥大型心筋症患者から樹立された iPS 細胞を分化誘導した心筋細胞特異的に出現する異常を指標にしたスクリーニング系を構築し、複数名から樹立した複数クローンを用いてスクリーニング系のバリデーションを行うとともに、市販化合物ライブラリーのスクリーニングを実施した。ヒト iPS 細胞を利用して難病に対する革新的な治療薬開発のための研究を実施できる可能性が示された。

キーワード：ヒト iPS 細胞 心筋細胞 ハイコンテンツスクリーニング

A. 研究目的

心筋症は心機能障害を伴う心筋疾患と定義されている難治性疾患である。ゲノム異常が原因で心筋細胞に起こる異常のために発症することが推測されているが、ゲノム異常が心筋細胞の異常を引き起こすメカニズムはブラックボックスとして残されており、治療薬の開発は進んでいない。

本研究の目的は、文部科学省「疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究」で心筋症患者から樹立された iPS 細胞を心筋細胞へと分化誘導し、疾患特異的に出現する異常表現型を指標にしたブラックボックススクリーニングを行い、心筋症に対する革新的な治療薬開発を目指すとともにヒット化合物の特性から心筋症の病態を明らかにすることである。

B. 研究方法

● iPS 細胞の培養

文部科学省「疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究」で心筋症患者から樹立された iPS 細胞、健常ボランティアから樹立された iPS

細胞は定法に則ってフィーダー細胞上で培養した。

● iPS 細胞の心筋細胞への分化誘導

我々が独自に開発した培養液および低分子化合物を利用した再現性の高い技術を利用して心筋細胞への分化誘導を行った。簡潔に要約すると、決められた密度で浮遊培養することで胚様体を形成させた後、決められた 5 種類の低分子化合物を作用させることで心筋細胞を分化誘導した。胚様体を解離した後にグルコースを含まない培養液中で培養し、非心筋細胞の成長を抑制することで心筋細胞を精製した。

● ハイコンテンツスクリーニング

分化誘導した心筋細胞を様々な条件で CellCarrier 96 (Perkin Elmer 社)に播種し、様々な化合物を作用させる期間として一定期間培養を行った後に、免疫染色で心室筋細胞を特定し、心室筋細胞の形態学的な特徴を解析した。撮像および定量解析