

198. 患者 iPS 細胞由来の心筋細胞を用いた心筋緻密化障害の病態解明

廣野 恵一

Key words : 心筋症, 心筋緻密化障害, iPS 細胞

富山大学附属病院 小児科

緒 言

心筋緻密化障害は、心室壁の過剰な網目状の肉柱形成と深い間隙を特徴とした心筋症で、難治性心不全や突然死の原因となる疾患である。2006 年の AHA 分類でも遺伝的要素の強い primary cardiomyopathy として分類されている。典型例は新生児期に心不全のため死亡し、心移植の対象になっている疾患である。

我々は、本邦で初めて心筋緻密化障害の症例を報告し、さらに全国調査を行い、その臨床像が心不全、不整脈や塞栓症など極めて多彩であることを報告した。また、心筋緻密化障害には遺伝的多様性があり、その発症には、Barth 症候群に見られる G45 (TAZ) 遺伝子の他、Dystrobrevin 遺伝子 (DTNA) 変異や細胞骨格蛋白関連遺伝子である cypher/ZASP(LDB3) など数多くの遺伝子が関与していることを明らかにした。しかしながら、これらの既知の遺伝子異常が認められる例は、10%未満に過ぎず、他の未知の遺伝子が原因となっている可能性が高い。

正常では、胎生期において、心室壁の発達は 2 層の心筋細胞層から始まり、続いて心内膜面から肉柱構造が形成されていく。ヒト胎生 8 週では、両心室が形成され心収縮力が増し、これに応じて肉柱層の緻密化が進む。同時に心外膜側からの冠動脈が発達し、心内膜面からの血液供給に変わって冠血流が主体になっていく。在胎週数とともに緻密層の肥厚が進み、らせん状に配列した心筋の 3 層構造が完成されていく。

心筋緻密化障害は、胎生初期の心室壁の発達の過程において、スポンジ状の胎児心筋が遺残し、心筋緻密層が低形成になると考えられている。そして、著明な肉柱形成のために心内膜面や肉柱間隙からの血液供給が障害され、心内膜下の心筋虚血を引き起こし、心機能低下が起こると仮説されている。しかし、現在までこの仮説は実証されていない。

方 法

臨床面と基礎研究面の両面から心筋緻密化障害の発症機構の解明するために、まず、心筋緻密化障害の臨床像を検討する。次に、心筋緻密化障害患者において、胎生期における心筋層の発達・成熟に関わる遺伝子異常の探索を行う。さらに、探索された遺伝子異常が心筋の発達・成熟に及ぼす影響を明らかにするために、患者 iPS 細胞由来心筋細胞を作製し、機能解析を行う。具体的には、以下の 4 項目を行った。

- 1) 患者の臨床像の検討
- 2) 患者血液サンプルの採取および遺伝子解析
- 3) 患者血液サンプルからの iPS 細胞の樹立および iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導
- 4) 患者 iPS 細胞由来心筋細胞の分化能および増殖能の評価、電気生理学的機能測定

結 果

1. 全国調査と臨床像の検討

小児期発症の心筋症の症例に対し、臨床像と遺伝的背景の有無を把握する。特に、家族性の有無、他の心筋症の有無、致死的不整脈や突然死の有無について検討を行った。

2. 患者血液サンプルの採取および遺伝子解析

検体を用いた遺伝子解析はすでに富山大学研究倫理委員会の承認を受けている（受付番号：遺伝子 24-2）。血液検体から DNA を抽出し PCR 法で増幅，ダイレクトシーケンス法で DNA の配列を調べ，表 1 にある遺伝子異常の有無を検討した．その結果，2 家系からサルコメアの 2 遺伝子異常が明らかとなった（図 1，2）．

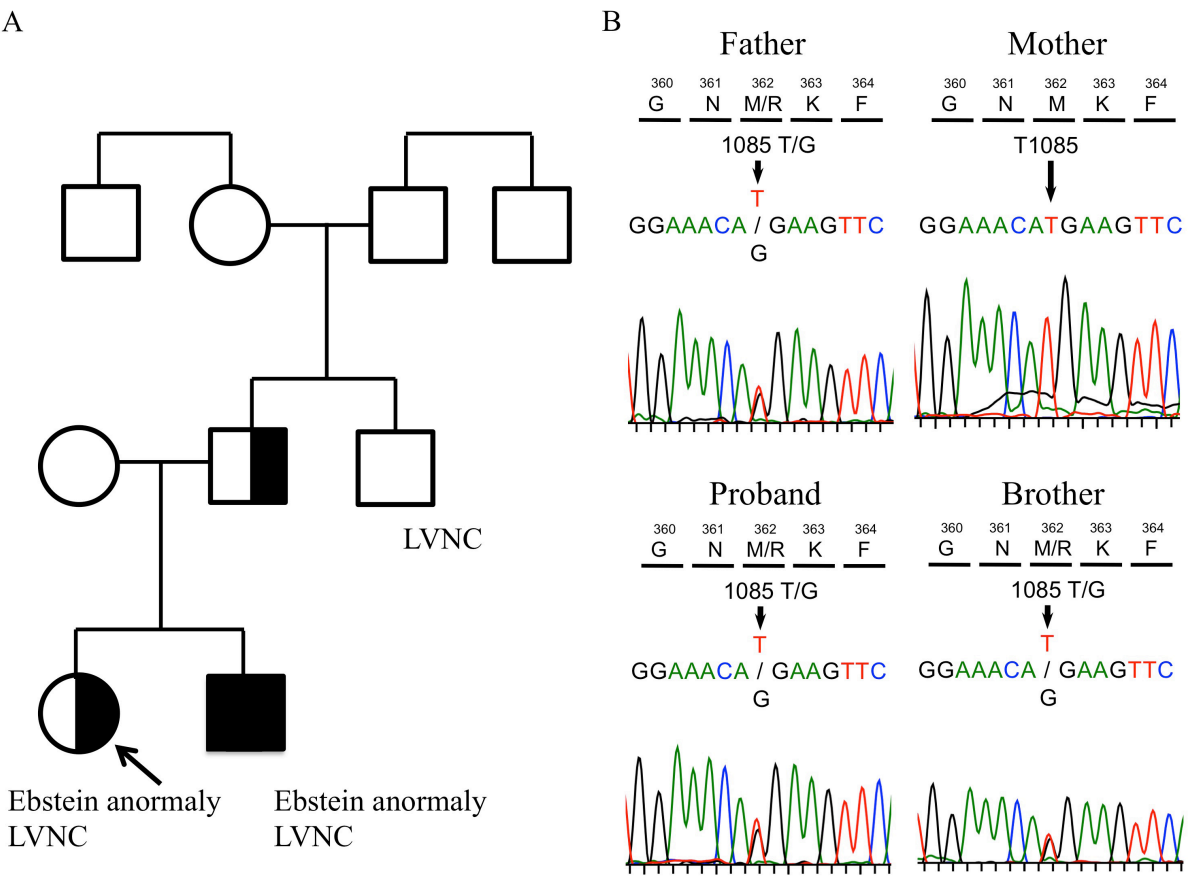


図 1. 心筋緻密化障害の 1 家系.
A) 家系図, B) 遺伝子変異.

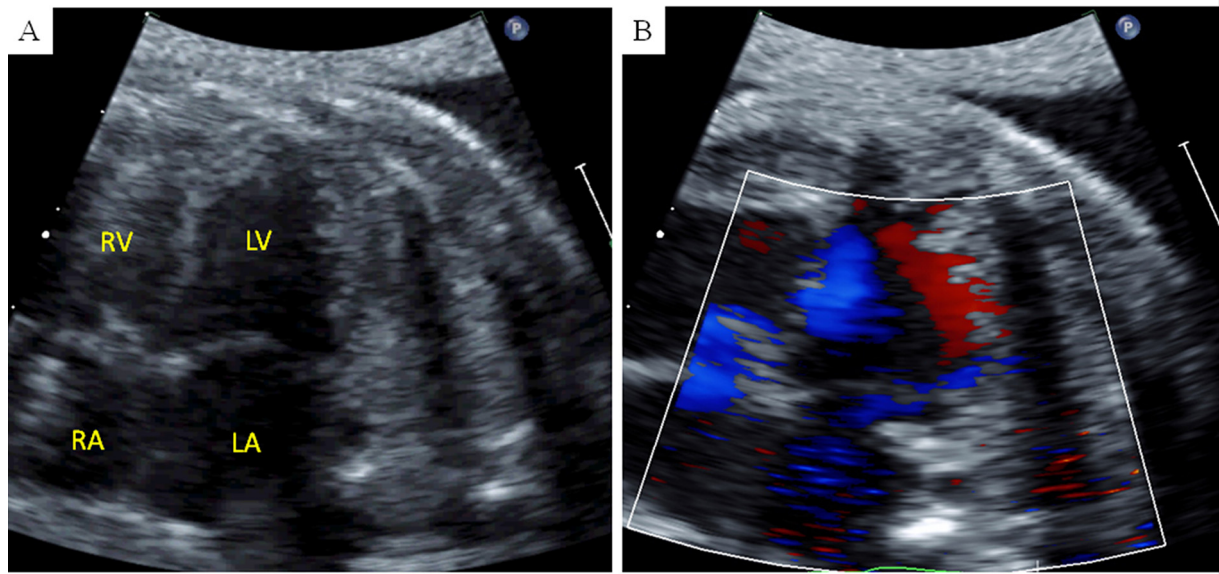


図2. 心筋緻密化障害患者の心エコー図.

A) 四腔断面像, B) カラードップラー画像.

3. 患者血液サンプルから iPS 細胞の樹立

採取したサンプルから、レンチウイルスベクターにより細胞のリプログラミングに必要な因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) を遺伝子導入し、iPS 細胞を作製した。得られた iPS 細胞については 機能解析にて未分化性を確認の上、心筋細胞への分化に利用する。まず、全ての株から DNA を抽出しシーケンスを行い、患者に由来する iPS 細胞に探索された遺伝子の変異が改変されていないことを確認した。さらに免疫蛍光染色法、リアルタイム PCR 等により、樹立した全ての iPS 細胞が万能性を示すことを確認した。

4. iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導

iPS 細胞を、Bone Morphogenetic Protein (BMP) およびその内因性阻害因子である Activin A, basic Fibroblast growth factor, Wnt 賦活剤および阻害剤を用いて、心筋細胞へと分化誘導を行った。

考 察

今後の課題として、以下の解析を検討している。

1. iPS 細胞由来心筋細胞の分化能評価

野生株と患者由来株の間で分化能および形態的な表現において差異を生じるか、遺伝子発現レベルおよび蛋白の発現レベルを評価する。遺伝子発現レベルは real-time RT-PCR にて野生株と患者由来株 iPS 細胞由来心筋細胞の TnnT や NKX2.5 などの心筋特異的 mRNA の発現を比較検討する。蛋白の発現レベルは免疫蛍光染色およびウェスタンブロット法にて野生株と患者由来株 iPS 細胞由来心筋細胞の TnnT や NKX2.5 などの心筋特異的蛋白の発現を比較検討する。

2. iPS 細胞由来心筋細胞の増殖能およびアポトーシスの評価

野生株と患者由来株の間で増殖能およびアポトーシスに差異を生じるか、Flow cytometry 法と免疫組織染色を行い評価する。増殖能に関しては、iPS 細胞由来心筋細胞を BrdU にて数日間培養し、BrdU を取り込ませた上で、細胞を回収し、抗 BrdU 抗体を用いて、BrdU 陽性細胞と非 BrdU 陽性細胞の比率を算出し、野生株と患者由来株間で比較検討する。アポトーシスに関しては、TUNEL 法を用いて、免疫染色を行い、野生株と患者由来株間で差異がないか比較検討する。

3. iPS 細胞由来心筋細胞の電気生理学的機能測定

パッチクランプ増幅器と倒立顕微鏡を用いて iPS 細胞由来心筋細胞からパッチクランプ法記録を行い、野生株と患者由来株の電気生理学的性質を比較し、催不整脈性の有無を検討する。具体的には静電容量、ナトリウムおよびカリウム等イオンチャネルの電流密度、活性化/不活性化/脱活性化/脱不活性化速度を検査する。また、64ch 細胞外電位記録システムを用いて活動電位の発火頻度および持続時間を検査する。さらに、iPS 細胞由来心筋細胞に蛍光カルシウム・イメージング法を適用し、心筋の収縮能に必要な細胞内カルシウムの動態を野生株と患者由来株で比較する。

文 献

- 1) Hirono, K., Hata, Y., Ibuki, K. & Yoshimura, N. : Familial Ebstein anomaly, left ventricular noncompaction, and ventricular septal defect associated with a MYH7 mutation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **148** : e223-226, 2014.
- 2) Nomura, Y., Momoi, N., Hirono, K., Hata, Y., Takasaki, A., Nishida, N. & Ichida, F. : A novel MYH7 gene mutation in a fetus with left ventricular noncompaction. *Can. J. Cardiol.*, **31** : 103, e1-3, 2015.