

原 著

先天性心疾患における不死化 B 細胞株由来 induced pluripotent stem (iPS) 細胞の樹立

川口 奈奈子¹⁾, 羽山 恵美子¹⁾, 古谷 喜幸¹⁾, 島田 光世¹⁾, 沖田 圭介²⁾,
長嶋 洋治³⁾, 竹内 大二¹⁾, 松岡 瑠美子⁴⁾, 中西 敏雄¹⁾

¹⁾ 東京女子医科大学循環器小児科

²⁾ 京都大学 iPS 細胞研究所初期化機構研究部門

³⁾ 東京女子医科大学病理診療科

⁴⁾ 若松河田クリニック

Establishment and Characterization of Induced Pluripotent (iPS) Stem Cells Derived from Immortalized B Cells of Cardiac Channelopathy Patients

Nanako Kawaguchi¹⁾, Emiko Hayama¹⁾, Yoshiyuki Furutani¹⁾, Mitsuyo Shimada¹⁾, Keisuke Okita²⁾,
Yoji Nagashima³⁾, Daiji Takeuchi¹⁾, Rumiko Matsuoka⁴⁾, and Toshio Nakanishi¹⁾

¹⁾ Department of Pediatric Cardiology, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

²⁾ Department of Stem Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan

³⁾ Department of Surgical Pathology, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

⁴⁾ Wakamatsu-Kawada Clinic, Tokyo, Japan

Our lab has identified the mutated genes responsible for congenital heart defects (CHD) using immortalized B cell lines established from the patient's blood. Using animal models, we have investigated how the mutations cause disease. However, because of the progress in induced pluripotent stem (iPS) cell technology, it would be better for us to use iPS cell-derived cardiac cells instead of mouse models. Therefore, we have established iPS cells from patients with long QT syndrome (LQTS) and sick sinus syndrome (SSS) and from normal controls. All established iPS cells expressed octamer-binding transcription factor-4 (Oct4), T-cell receptor alpha-1-60 (TRA-1-60), stage-specific embryonic antigen-4 (SSEA4), and Nanog genes and proteins and were alkaline phosphatase-positive. The mutated genes were not altered after reprogramming. Moreover, Epstein-Barr (EB) viral genes were not expressed after reprogramming. These results suggest that cardiac cells, such as cardiomyocytes, derived from iPS cells reflect the mutations of specific diseases and have no artifacts from the EB virus. Therefore, iPS cell-derived cardiac cells can be used as a powerful tool in *in vitro* disease models.

背景：先天性心疾患患者や遺伝性不整脈患者で観察される心電図の波形異常は、心筋細胞におけるチャネルの異常や細胞肥大などによって生じる。我々は、これまでに先天性心疾患患者や遺伝性不整脈患者から Epstein-Barr (EB) ウイルス感染により不死化した B 細胞株を樹立し、疾患原因遺伝子ならびにその変異を同定し、マウスモデルなどを用いて変異に関する機能解析を行ってきた。

目的：疾患特異的 induced pluripotent stem (iPS) 細胞由来心筋細胞を作製して機能解析を行うため、心疾患患者由来の不死化 B 細胞株から iPS 細胞の作製を行った。

方法：洞不全症候群患者の不死化 B 細胞株にマウス *p53DD* (dominant-negative), ヒト *c-MYC*, *LIN28*, *SOX2*, *KLF-4*, *OCT3/4* を電気刺激により導入した。

結果：遺伝子導入から約 3 週間の培養後、iPS 細胞の形状を示す細胞が観察された。この細胞は、免疫

2014 年 12 月 24 日受付, 2015 年 8 月 31 日受理

別刷り請求先: 〒162-8666 東京都新宿区河田町 8-1 東京女子医科大学循環器小児科 中西敏雄

doi: 10.9794/jspccs.31.313

染色の結果、胚性幹細胞 (Embryonic stem cell) のマーカーとされる, Oct4, TRA-1-60, SSEA4, Nanog 陽性であり, アルカリフォスファターゼ活性が陽性反応を示した. iPS 細胞化においても, 患者が有する遺伝子変異は保持され, EB ウイルスのゲノムは iPS 細胞化により消失した.

考察: 疾患特異的 iPS 細胞が得られた. iPS 化においても, 疾患遺伝子の変異が保持され, EB ウイルスの遺伝子発現が消失することは, ウイルスが影響しない病態モデルが作製可能であると考えられる.

結論: 山中 4 因子と *mp53DD*, *hLIN28* 遺伝子を導入して患者由来不死化 B 細胞から疾患特異的 iPS 細胞が作製されたことから, 病態モデルの作製が期待される.

Keywords: induced pluripotent cells, in vitro disease model, cardiomyocyte, channel, mutation

はじめに

我々は, 先天性心疾患患者の遺伝子解析による原因の特定と, その治療法の検討を目的とした研究のためのツールとして, インフォームドコンセントを得た患者およびその家族から血液を採取し, EB ウイルス感染による不死化細胞株を 4200 株以上樹立した. その細胞から病因遺伝子をシーケンスにより変異場所を同定するだけでなく, その変異が病態形成にどのようなつながっていくのかについても, 検討を加えてきた¹⁻¹⁰⁾. たとえば, Noonan 症候群患者においては, *RAF1* 遺伝子の変異を同定した. この変異を含んだコンストラクトを導入した細胞では, *in vitro*でのキナーゼ活性の亢進や ERK の活性化が認められた. またゼブラフィッシュ胚でのモルフォリノを用いた *raf1* のノックダウンにより, 正常な心筋構造やその機能の発達に *raf1* が必要であることが示され, MAPK 経路を活性化する新しいシグナル伝達機構であることが明らかになった¹¹⁾.

2006 年にマウスの iPS 細胞¹²⁾, 2007 年にヒトの iPS 細胞^{13, 14)} の作製が成功し, このような幹細胞が心筋細胞や神経細胞などへの分化能を有することが報

告され, iPS 細胞は, 再生医療や, 創薬に有用であることは多くの研究者が認めるところである. 最近, 網膜色素変性症の治療のために iPS 細胞から網膜色素上皮細胞を作製し, 移植する臨床応用が行われて, 再生医療への実用化が開始されたことで注目された¹⁵⁾. 従来は変異動物を作製してその心臓における機能の異常を解析していたが, このように iPS 細胞作製, および分化誘導技術が向上したことから, 先天性心疾患患

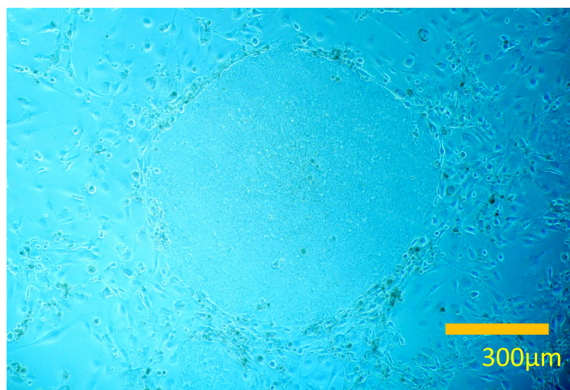


Fig. 1 A photographic image of iPS cells derived from B cells of a patient with LQTS

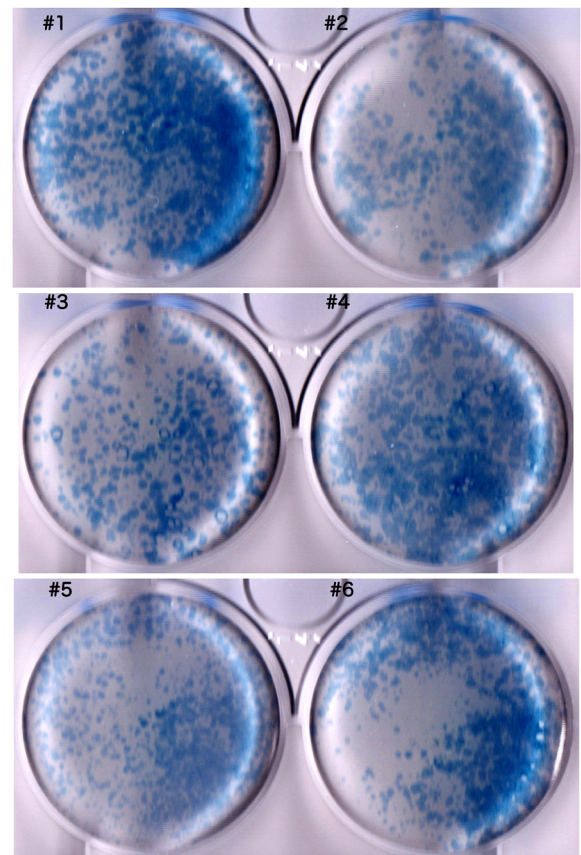


Fig. 2 Established iPS cells (#1 and #2 from normal controls, #3, #4, and #5 from patients with SSS, and #6 from a patient with LQT) are positive for alkaline phosphatase

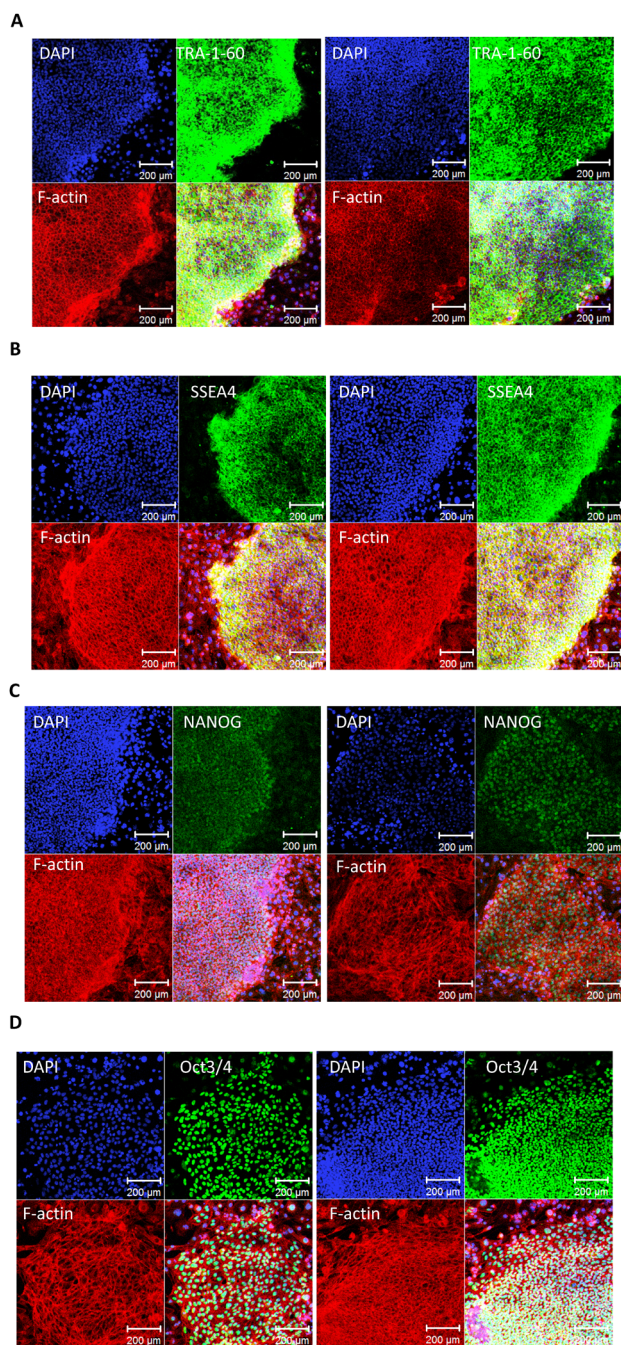


Fig. 3 Established iPS cells (left 4 panels are from #3 and right 4 panels are from #6) express TRA-1-60 (A), SSEA4 (B), Nanog (C), and Oct4 (D) proteins

者由来の B 細胞株から iPS 細胞の樹立し、これらの iPS 細胞から心筋細胞を作製し、ヒトの心筋細胞で機能の解析を行うことは有効である。

iPS 細胞由来心筋細胞の作製および先天性心疾患患者から作製された iPS 細胞由来心筋細胞 (病態モデル)

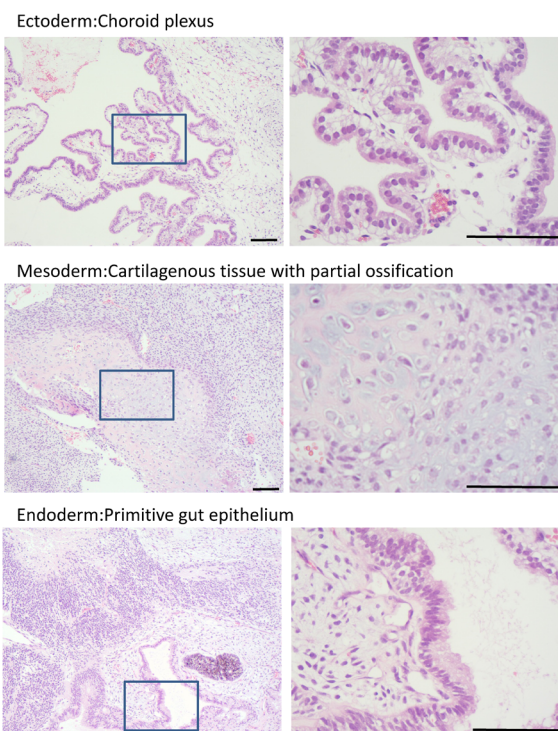


Fig. 4 Teratoma formation using #4 iPS cells

Teratoma tissues were removed from the testes of mice with severe combined immunodeficiency and fixed, sliced, and stained with hematoxylin and eosin. The left panels show lower magnification and the right panels show higher magnification of the boxed area (bar scale: 100 μm). All three germ layers were developed.

については、QT 延長症候群など、心筋の拍動を司るイオンチャネルの遺伝子 (*SCN5A*, *KCNQ1*) 変異による疾患について、解析が進められてきた¹⁶⁻²³⁾。そこで、我々も、QT 延長症候群、洞不全症候群 (sick sinus syndrome; SSS) の病態モデルを作製するため、QT 延長症候群、洞不全症候群と診断された患者の末梢血液細胞から不死化 B 細胞を樹立し、この細胞を用いて iPS 細胞が作製できるかどうか、まず検討した。B 細胞の不死化は、希少患者の血液サンプルを有効に使用できるため、多くの研究室で使われている手法である。最近、EB ウイルス感染により不死化した細胞株からも iPS 細胞が作製されることが報告されており^{24, 25)}、我々も、このような先行研究を参考にして、iPS 細胞作製を試みた。その結果、iPS 細胞の特徴である、アルカリフォスファターゼ活性が陽性反応を示し、胚性幹細胞 (embryonic stem (ES) cells) 特異的遺伝子を発現する ES 細胞の形態を示す細胞が観察されたので、ここに報告する。



Fig. 5 Karyotype analysis using #4 iPS cells. No abnormalities were observed

方 法

インフォームドコンセントを得た患者から血液を採取し、B細胞にEBウイルスを感染させて²⁶⁾、細胞不死化B細胞を樹立した（東京女子医科大学倫理委員会承認済みである）。その細胞に、プログラムされたパルスの電気刺激（スーパーエレktロポレーターNEPA21[®]）を与え、6種類の遺伝子、すなわち、ヒト *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF-4*, *c-MYC*, *LIN28*, マウス *p53DD* (c-terminal dominant negative) が入ったエピソードベクターを導入した (pCE-hOCT3/4, pCEhSK, pCE-hUL, pCD-mp53DD)^{27, 28)}。その細胞を、マイトマイシンC処理したSNL細胞（フィーダー細胞）上に播き、ES細胞用培地中でiPS様細胞が出現するまで約3週間培養した。

培養液は、1, 2日ごとに交換した。iPS細胞は、reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), 免疫染色法によって、ES細胞特異的遺伝子とタンパク質発現を確認した。また、免疫不全マウス (SCID マウス, CB-17/Icr-scid/scid) の精巣に移植し

てテラトーマを形成させ、三胚葉への分化能を観察した。核型解析により、核型の異常が起こっていないか検討した。さらに、作製されたiPS細胞において、心疾患の原因遺伝子の変異が保たれているか否かをシーケンスで確認した。また、EBウイルスの遺伝子発現が、iPS化によりどのように変化するか、RT-PCR法により検討した。

結 果

患者由来EBウイルス感染B細胞に、電気刺激による初期化遺伝子導入効率を検討したところ、ポワリング電圧 (150V) パルス (5ms) 刺激による遺伝子導入が、最も高い導入効率を示したため、この条件で遺伝子導入を行った。約3週間の培養後、iPS細胞の形状を示す細胞が観察された。Fig. 1にQT延長症候群患者由来B細胞から作製されたiPS細胞を示す。健康者 (#1, 2), SSS症候群患者 (#3, 4, 5), ならびにQT延長症候群患者 (#6) 由来B細胞株から作製されたiPS細胞は、すべて、アルカリフォスファターゼ

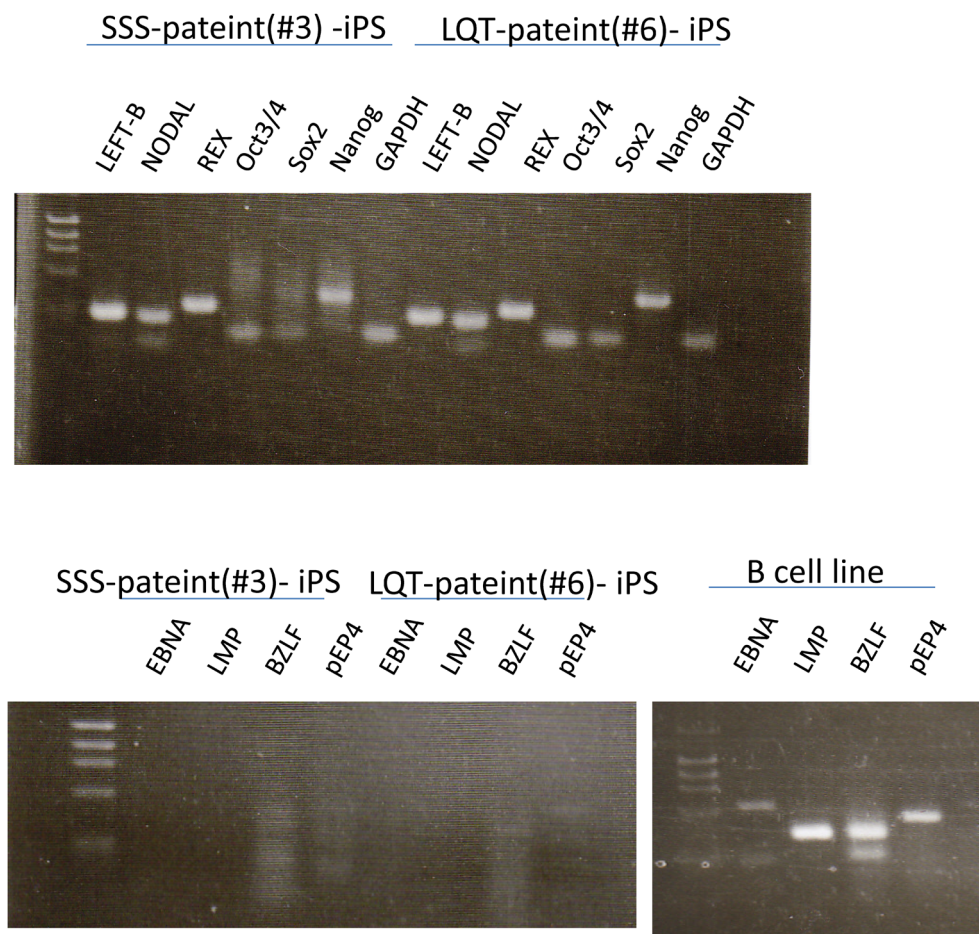


Fig. 6 Gene expression of the embryonic stem and viral genes in established iPS cells

Upper Panel: Embryonic stem gene expression was observed in the iPS cells established from immortalized patient-derived B cell lines. *Lower Panel: Left:* EB virus-derived gene expression diminished in the iPS cells established from immortalized patient-derived B cell lines. *Right:* Immortalized B cells from the patients with the EB virus have expression of the viral genes.

活性が陽性反応を示した (Fig. 2). 免疫染色の結果, これらの iPS 細胞は, ES 細胞のマーカーとされる, TRA-1-60, SSEA4, Oct4, Nanog 陽性であった. Fig. 3 に, #3 および #6 の例を示す. また, 免疫不全マウスの精巣において移植を行ったところ, テラトーマが形成され, 三胚葉に由来する組織への分化が確認された (Fig. 4). さらに, 核型解析を行ったが, 染色体の異常は見られなかった (Fig. 5).

作製した iPS 細胞の ES 細胞に発現する遺伝子の発現を RT-PCR 法により検討したところ, ES 細胞に発現する遺伝子である *LEFT-B*, *NODAL*, *REX*, *OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG* の遺伝子発現が検出された. Fig. 6 に, #3 および #6 の結果を典型例として示す. その発現量は, 山中らが作製した iPS 細胞 (253G1) と同様のレベルであった (data not shown). 心疾患の原因遺伝子の変異は, iPS 化後も保持されていた (data

not shown). 一方, 不死化細胞樹立に用いられた EB ウイルスの遺伝子発現 (*EBNA*, *LMP*, *BZLF*, *pEP4*) は消失しており, サイレンス化していることが確認された (Fig. 6).

考 察

今回心疾患患者由来細胞から作製された iPS 様細胞は, ES 細胞と類似した遺伝子発現, タンパク質発現を示すことのみならず, マウス精巣移植後に形成されたテラトーマでの三胚葉分化が示され, 核型解析により, 染色体の正常な形態を示したことから, iPS 細胞であると結論する. さらに, 今後, 病態モデルとして用いられるには, 自発的拍動を行うような心筋細胞へと分化させることが次の課題である. 我々は, これらの点において, 現在検討を進めている²⁹⁾.

iPS 化により、心疾患原因遺伝子の変異が変化することはなかった。それに対して、不死化 B 細胞樹立に用いられた EB ウイルスの遺伝子発現が消失することは、以前の報告にもあった^{30,31)}。これらの結果は、ウイルス由来分子がアーティファクトをもたらすことなく、病因遺伝子の保持により、病態が保持されると考えられ、病態モデル作製には、利点であると考えられる。

今回作製した、iPS 細胞の一つは、洞不全症候群の患者由来であり、この疾患は、SCN5A 遺伝子のエクソン 9 内の G1100G, A[Arg367Arg, His] の変異によって起こる³²⁾。SCN5A は、Na チャネル遺伝子であり、この遺伝子に変異が起こると、洞結節から心筋細胞への信号伝導に異常を生じ、心筋細胞の収縮に異常が起こる。SCN5A 変異による心臓病は、QT 延長症候群や Brugada 症候群が知られている³³⁻³⁸⁾。また、遺伝子変異とこのような異常の発生に至る過程は、解明されていない。今後、iPS 細胞由来心筋細胞のみならず、信号を作り出す洞結節の細胞、プルキンエ細胞なども作製することによって心臓内での信号伝達の機構がより明確になることが望まれると考えられる。

遺伝子変異をもつ先天性心疾患患者由来 iPS 細胞から心筋細胞を始めとする心臓の細胞を作製して、病態モデルを作製すれば、遺伝子変異と病態の関連性および、治療法の開発に役立てることができる。今後、このような包括的なシステムを構築し、病状の情報、遺伝子変異情報、家族情報との関連性を探索していく。

引用文献

- 1) Dhandapany PS, Razzaque MA, Muthusami U, et al: RAF1 mutations in childhood-onset dilated cardiomyopathy. *Nat Genet* 2014; **46**: 635-639
- 2) Fujita E, Nakanishi T, Nishizawa T, et al: Mutations in the cardiac troponin T gene show various prognoses in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart Vessels* 2013; **28**: 785-794
- 3) Chida A, Shintani M, Yagi H, et al: Outcomes of childhood pulmonary arterial hypertension in BMPR2 and ALK1 mutation carriers. *Am J Cardiol* 2012; **110**: 586-593
- 4) Kodo K, Nishizawa T, Furutani M, et al: Genetic analysis of essential cardiac transcription factors in 256 patients with non-syndromic congenital heart defects. *Circ J* 2012; **76**: 1703-1711
- 5) Razzaque MA, Komoike Y, Nishizawa T, et al: Characterization of a novel KRAS mutation identified in Noonan Syndrome. *Am J Med Genet* 2012; **158A**: 524-532
- 6) Tsutsumi Y, Kosaki R, Itoh Y, et al: Vein of Galen aneurysmal malformation associated with an endoglin gene mutation. *Pediatrics* 2011; **128**: e1307-e1310
- 7) Kodo K, Nishizawa T, Furutani M, et al: GATA6 mutations cause human cardiac outflow tract defects by disrupting semaphorin-plexin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 13933-13938
- 8) Tang S, Hoshida H, Kamisago M, et al: Phenotype-genotype correlation in a patient with co-occurrence of Marfan and LEOPARD syndromes. *Am J Med Genet A* 2009; **149A**: 216-2219
- 9) Shintani M, Yagi H, Nakayama T, et al: A new nonsense mutation of SMAD8 associated with pulmonary arterial hypertension. *J Med Genet* 2009; **46**: 331-337
- 10) Fujiwara M, Yagi H, Matsuoka R, et al: Implications of mutations of activin receptor-like kinase 1 gene (ALK1) in addition to bone morphogenetic protein receptor II gene (BMPR2) in children with pulmonary arterial hypertension. *Circ J* 2008; **72**: 127-133
- 11) Razzaque MA, Nishizawa T, Komoike Y, et al: A Germline gain-of-function mutations in RAF1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2007; **39**: 1013-1017
- 12) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; **126**: 663-676
- 13) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al: Induction of pluripotent stem cells from human adult fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; **131**: 861-872
- 14) Park I-H, Zhao R, West JA, et al: Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 2007; **451**: 141-147
- 15) Reardon S, Cyranoski D: Japan stem-cell trial stirs envy. *Nature* 2014; **513**: 287-288
- 16) Yoshida Y, Yamanaka S: iPS cells: A source of cardiac regeneration. *J Mol Cell Cardiol* 2011; **50**: 327-332
- 17) Kawaguchi N, Hayama E, Furutani Y, et al: Prospective in vitro models of channelopathies and cardiomyopathies. *Stem Cells Int* 2012; **2012**: e439219
- 18) 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**: 1397-1409
- 19) Zhang H, Zou B, Yu H, et al: Modulation of hERG potassium channel gating normalizes action potential duration prolonged by dysfunctional KCNQ1 potassium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; **109**: 11866-11871
- 20) Itzhaki I, Maizels L, Huber I, et al: Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; **471**: 225-229
- 21) Matsa E, Rajamohan D, Dick E, et al: Drug evaluation in cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells carrying a long QT syndrome type 2 mutation. *Eur Heart J* 2011; **32**: 952-962
- 22) Malan D, Friedrichs S, Fleischmann BK, et al: Cardiomyocytes obtained from induced pluripotent stem cells with long-QT syndrome 3 recapitulate typical diseasespecific features in vitro. *Circ Res* 2011; **109**: 841-847
- 23) Carvajal-Vergara X, Sevilla A, D'souza SL, et al: Patientspecific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature* 2010; **465**: 808-812
- 24) Choi SM, Liu H, Chaundhari P: Reprogramming of EBV-immortalized B-lymphocyte cell lines into induced pluripotent stem cells. *Blood* 2011; **118**: 1801-1805
- 25) Rajesh D, Dickerson SJ, Yu J, et al: Human lymphoblastoid B-cell lines reprogrammed to EBV-free induced pluripotent stem cells. *Blood* 2011; **118**: 1797-1800

- 26) Amoll MM, Carthy D, Ollier WER: EBV immortalization of human B lymphocytes separated from small volumes of cryo-preserved whole blood. *Int J Epidemiology* 2008; **37** Suppl 1: i41–i45
- 27) Okita K, Matsumura Y, Sato Y, et al: A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 2011; **8**: 409–412
- 28) Okita K, Yamakawa T, Matsumura Y, et al: An efficient nonviral method to generate integration-free human induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells* 2013; **31**: 458–466
- 29) Hayama E, Furutani Y, Kawaguchi N, et al: Manuscript in preparation
- 30) Rajesh D, Dickerson SJ, Yu J, et al: Human lymphoblastoid B-cell lines reprogrammed to EBV-free induced pluripotent stem cells. *Blood* 2011; **118**: 1797–1800
- 31) Choi SM, Liu H, Chaudhari P, et al: Reprogramming of EBV-immortalized B-lymphocyte cell lines into induced pluripotent stem cells. *Blood* 2011; **118**: 1801–1805
- 32) Vatta M, Dumaine R, Antzelevitch C, et al: Novel Mutations in domain 1 of SCN5A cause Brugada syndrome. *Mol Genet Metab* 2002; **75**: 317–324
- 33) Wang Q, Curran ME, Splawski I, et al: Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* 1996; **12**: 17–23
- 34) Curran ME, Splawski I, Timothy KW, et al: A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 1995; **80**: 795–803
- 35) Splawski I, Tristani-Firouzi M, Lehmann MH, et al: Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress lks function. *Nat Genet* 1997; **17**: 338–340
- 36) Wang Q, Shen J, Splawski I, et al: SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 1995; **80**: 805–811
- 37) Yamagishi H, Furutani M, Kamisago M, et al: A de novo missense mutation (R1623Q) of the SCN5A gene in a Japanese girl with sporadic long QT syndrome. *Hum Mutat* 1998; **11**: 481
- 38) Splawski I, Timothy KW, Vincint GM, et al: Molecular basis of the long QT syndrome associated with deafness. *N Engl J Med* 1997; **336**: 1562–1567