

主論文の要旨

**Flecainide ameliorates arrhythmogenicity
through NCX flux in Andersen-Tawil syndrome-
iPS cell-derived cardiomyocytes**

Andersen 症候群人工多能性幹細胞由来心筋において
フレカイニドはナトリウム・カルシウム交換系を介して
不整脈を改善する

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻
器官系機能調節学講座 心・血管学分野

(指導：神谷 香一郎 教授)

黒田 裕介

【緒言】

Andersen-Tawil 症候群(ATS)は 1971 年に Andersen らによって報告された稀な遺伝性疾患で、周期性四肢麻痺、骨格異常、心室性不整脈を特徴とする。本症は内向き整流 K チャネル(Kir2.1)をコードする *KCNJ2* 遺伝子変異により引き起こされ、心室活動電位を構成する I_{K1} 電流が減少することで、致死性不整脈を含む心室性不整脈や心電図での U 波を生じる。致死性不整脈に対しては植込み型除細動器が用いられ、各種抗不整脈薬が使用されているが、本疾患に有効な治療法は未だ確立されていない。

今回我々は、初めて ATS 疾患特異的 iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞を用いて、病態の解明と有効な薬剤の検索を行った。

【方法】

①疾患特異的 iPS 細胞の樹立

3 名の患者(*KCNJ2* R218W、R67W、R218Q)の末梢血から得た T リンパ球に Sendai virus vector を用いて *OCT3/4*、*SOX2*、*KLF4*、*c-MYC* を遺伝子導入し iPS 細胞を樹立した。

②心筋細胞への分化誘導

iPS 細胞を分化培地で浮遊培養することで胚様体を得た。分化誘導後約 10~14 日で自律拍動する心筋を得た。分化誘導後 60~80 日培養し成熟した心筋を用いて電気生理学的解析を行った。

③パッチクランプ法による活動電位の解析

パッチクランプ法を用いて iPS 細胞由来心筋(iPSC-CM)の活動電位を記録し、対照群と比較検討した。

④細胞外電位記録による解析

Multi-electrode array(MEA)を用いて iPSC-CM の細胞外電位を記録し、心電図での QT 時間に相当する field potential duration(FPD)を測定した。Isoproterenol、Flecainide、Pilsicainide を投与し不整な細胞外電位の発生頻度を対照群と比較検討した。

⑤細胞内 Ca^{2+} 動態の解析

Ca^{2+} 蛍光プローブ Fluo-4 AM を用いて細胞内 Ca^{2+} 動態を解析した。

⑥パッチクランプ法による Na^+ / Ca^{2+} 交換系(NCX)電流(I_{NCX})の測定

guinea-pig 心室筋を用いて Flecainide 投与前後で I_{NCX} を測定し比較検討した。

【結果】

樹立された iPS 細胞が NANOG、*OCT3/4*、*Tra-1-81*、*SSEA3* の各未分化マーカーを発現していることを免疫染色法により確認した(Figure 2a)。また樹立された細胞が奇形腫を形成することを確認し多能性を持つことを証明した(Figure 2b)。得られた iPS 細胞の DNA 解析を行い、患者と同じ遺伝子変異が保存されていることを確認した(Figure 1)。分化誘導した心筋が、 α -actinin、cardiac troponin T、ANP、*GATA4* の各心筋特異的マーカーを発現していることを免疫染色法により確認した(Figure 2c)。細

胞外電位記録において拍動数、corrected FPD に各群間で有意差を認めなかった(Figure 3a-c)。活動電位についても各群間で有意差を認めなかった(Figure 3d-j)。Isoproterenol 負荷により疾患群において有意に高頻度に不整な細胞外電位の発生を認めた($p < 0.05$ 、Figure 4a-c)。不整な細胞外電位は疾患群において Flecainide により有意に抑制された($p < 0.01$ 、Figure 4d)。細胞内 Ca^{2+} 動態を比較すると、異常な細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は疾患群において有意に高頻度で認められた($p < 0.05$ 、Figure 5a、b)。 Ca^{2+} transient については、intensity 以外の各パラメーターに両群間で差を認めなかった(Figure 5c-h)。疾患群で認められた異常な細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は Flecainide により有意に抑制された($p < 0.05$ 、Figure 5i-k)。 Na^+ チャネル遮断薬である Pilsicainide は疾患群で認めた不整な細胞外電位を抑制しなかった(Figure 6a、b)。疾患群で認めた異常な細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は NCX 阻害薬である KB-R7943 により有意に抑制された($p < 0.05$ 、Figure 6c)。 guinea-pig 心室筋で Flecainide 投与前後の I_{NCX} を測定したところ、Flecainide は I_{NCX} を有意に増加させることが分かった($p < 0.01$ 、Figure 7a-d)。

【考察】

遺伝性心疾患の解析においては患者由来の細胞や組織を用いるのが理想的だが、ヒト心筋は貴重であり実験材料として用いることは困難である。代替法として従来、他の動物種(マウスなど)の心筋細胞・組織を用いたり、遺伝子導入技術による強制発現モデルを利用して、多くの重要な知見が得られてきたが、動物種間での心拍数の違いやイオンチャネル・活動電位の特性の違いなど無視できない影響が存在し、モデルとして制約があった。

疾患特異的 iPS 細胞は患者由来の少量の血液から安定して樹立することができ、遺伝性疾患の解析に必要な患者の遺伝情報を有している。増殖し分化誘導することで得られるヒト心筋は、病態の解明や新しい治療法の開発に極めて有益なツールといえる。

今回我々は3名の ATS 患者から iPS 細胞を樹立し、分化誘導した心筋細胞を用いて解析を行った。

電気生理学的解析において、疾患群で有意に高頻度に認められた不整な細胞外電位は本疾患の表現型と考えられ、これらを Flecainide が有意に抑制したことから Flecainide は本疾患に有効な治療薬と考えられた。 Na チャネル遮断薬である Pilsicainide は疾患群で認めた不整な電位を抑制せず、Flecainide の薬効は Na チャネル遮断以外の機序によると考えられた。細胞内 Ca^{2+} 動態の解析では、疾患群において異常な細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を認め、細胞内 Ca^{2+} 過負荷が病態として存在している可能性が示唆された。Flecainide はこの異常な細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を改善した。細胞内 Ca^{2+} 動態は主に SERCA2a、Ryanodine 受容体、NCX 等により調節されているが、疾患群において認められた Ca^{2+} 濃度上昇は NCX 阻害薬である KB-R7943 により抑制されることが分かった。 guinea-pig 心室筋を用いた実験では、Flecainide は I_{NCX} を有意に増加させ、 I_{NCX} に対して直接作用を持つことが判明した。

本研究の limitation は、第一に iPSC-CM の成熟が不十分な可能性があることである。本研究においては全てのチャンネルが発現するとされる分化誘導後 60~80 日の細胞を使用しているが、完全に成熟した心筋とは言えない。第二に本研究では 2 名の健常者由来の iPSC-CM を対照としているが、遺伝的背景が異なるため、疾患の表現型発現に影響を与えた可能性を完全には否定できない点である。第三としては I_{K1} 電流が非常に小さく、技術的な問題で測定できていないことである。

【結語】

疾患特異的 iPS 細胞は病態の解明や新しい治療法の開発に有益なツールである。ATS において Flecainide は NCX を介して不整脈を改善させる可能性がある。