

## Review

## 疾患特異的 iPS 細胞を用いた先天性心疾患の病態解明

小林 純子<sup>1)</sup>, 佐野 俊二<sup>1)</sup>, 王 英正<sup>2)</sup><sup>1)</sup>岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 心臓血管外科<sup>2)</sup>岡山大学病院 新医療研究開発センター 再生医療部

## Congenital Heart Diseases and Disease-specific iPS Cells

Junko Kobayashi<sup>1)</sup>, Shunji Sano<sup>1)</sup>, and Hidemasa Oh<sup>2)</sup><sup>1)</sup>Department of Cardiovascular Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, Okayama University Hospital, Okayama, Japan<sup>2)</sup>Department of Regenerative Medicine, Center for Innovative Clinical Medicine, Okayama University Hospital, Okayama, Japan

Since induced pluripotent stem (iPS) cells have been generated in 2007 from human somatic cells, many studies of disease-specific iPS cells have been reported. Because disease-specific iPS cells can recapitulate disease phenotypes, they are expected to be a novel research tool for *in vitro* disease modeling to dissect pathogenesis and assist in drug discovery. In terms of cardiovascular diseases, most of the iPS cells have been generated from the patients with inherited arrhythmias or cardiomyopathy. There have been few reports of human iPS cells established from the patients with congenital heart diseases composed of abnormal structures. Most congenital heart diseases are considered to be caused by combinatorial repression of transcription factors and/or impaired epigenetic regulation. Recently, we successfully generated iPS cells from the patients with hypoplastic left heart syndrome (HLHS). We showed that these HLHS-specific iPS cells recapitulated pathogenesis and worked as *in vitro* disease models for investigating the function of transcription factors during the course of cardiac lineage specification. In this review, we provide an overview of cardiac disease-specific iPS cells and discuss possible uses for dissecting the underlying mechanisms of congenital heart diseases.

2007年にヒト人工多能性幹 (induced pluripotent stem: iPS) 細胞の樹立に成功して以来、疾患特異的 iPS 細胞の研究が進められてきた。病態発生過程を *in vitro* で再現できる疾患特異的 iPS 細胞は、新たな疾患モデルとして病態解明や創薬のための利用が期待される。疾患特異的 iPS 細胞は心疾患モデルとしても多数樹立されてきたが、これまでは主に遺伝性の不整脈性疾患や心筋症から樹立されており、形態異常を伴う先天性心疾患からは樹立されてこなかった。最近、我々は左心低形成症候群 (hypoplastic left heart syndrome: HLHS) 由来の疾患特異的 iPS 細胞の樹立に成功した。遺伝子異常のみならず、遺伝子発現の低下やエピジェネティック制御の異常など、多数の因子が複雑に関与すると考えられる先天性心疾患の病態解明にも、疾患特異的 iPS 細胞は有用である可能性がある。本総説では、疾患特異的 iPS 細胞を用いた心疾患モデルの経緯を概説し、また疾患特異的 iPS 細胞による先天性心疾患の病態解明への可能性を検討する。

Keywords: disease-specific iPS cells, congenital heart diseases, differentiation, transcription factors, chromatin remodeling

2015年1月22日受付, 2015年5月22日受理

別刷り請求先: 〒700-8558 岡山県岡山市北区鹿田町 2-5-1 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 心臓血管外科 小林純子

doi: 10.9794/jspccs.31.138

## はじめに

2006年に京都大学の山中伸弥教授によりマウス人工多能性幹 (induced pluripotent stem: iPS) 細胞の樹立成功が発表され<sup>1)</sup>, 翌2007年には山中教授や Thomsonらによりそれぞれヒト iPS 細胞が樹立された<sup>2, 3)</sup>. この体細胞から多能性幹細胞を作製するという画期的な技術により, 理論上すべてのヒトから多能性幹細胞を樹立できることとなった. 以来, 特定の病気を患った患者から樹立した「疾患特異的 iPS 細胞」の研究が行われるようになった. 疾患特異的 iPS 細胞は, ヒトの病態発生過程を *in vitro* で再現することができるため, 新たな疾患モデルとして病態解明や創薬への利用が期待されている. 疾患特異的 iPS 細胞は, 循環器疾患患者からも樹立され解析されてきたが, 対象となったのは主に遺伝性の不整脈性疾患や心筋症に限定されており<sup>4, 5)</sup>, 遺伝的背景が不明瞭な, かつ心臓の形態異常を伴う先天性心疾患患者からは樹立されてこなかった. しかし, 遺伝子変異が原因とならない場合が多い先天性心疾患の病態解明にこそ, 発生過程における分子制御機構を網羅的に解析できる疾患特異的 iPS 細胞は有用である可能性があり, 報告もされ始めている<sup>6)</sup>. 我々も左心低形成症候群 (hypoplastic left heart syndrome: HLHS) の疾患特異的 iPS 細胞の樹立に成功し, その病態発生機序の解析を行った<sup>7)</sup>. 本総説では, これまでの心疾患における疾患特異的 iPS 細胞の研究と心臓発生や先天性心疾患の分子制御機構を概説し, 先天性心疾患由来の疾患特異的 iPS 細胞の有用性を検討した.

## 疾患特異的 iPS 細胞による心疾患モデル

心疾患での疾患特異的 iPS 細胞は, これまで主に遺伝性の不整脈や心筋症患者から樹立されてきた<sup>4, 5)</sup>. 具体的には, 先天性 QT 延長症候群, カテコラミン誘発性多形性心室頻拍, 肥大型心筋症, 拡張型心筋症, 不整脈源性右室心筋症, LEOPARD 症候群, Pompe 病, Friedreich 失調症が挙げられる (Table 1).

先天性 QT 延長症候群は, 60~70%の家系で心筋細胞のイオンチャネルや細胞膜構成蛋白に関連した遺伝子異常を認めており疾患の原因とされているが, 疾患特異的 iPS 細胞は, Romano-Ward 症候群のうち LQT1, 2, 3, 8 の患者より樹立されている. LQT1 は 6 回貫通型 K<sup>+</sup>チャネルをコードする potassium channel, voltage gated KQT-like subfamily Q, member 1 (KCNQ1), LQT2 は電位依存性 K<sup>+</sup>チャネルをコードする potassium channel, voltage gated eag related subfamily H, member 2 (KCNH2), LQT3 は電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネルをコードする sodium channel, voltage gated, type V alpha subunit (SCN5A), LQT8 (Timothy 症候群) は電位依存性 L 型 Ca<sup>2+</sup>チャネルをコードする calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit (CACNA1C) の異常が関与しており, それぞれの遺伝子変異を持つ患者から iPS 細胞は樹立され, 電気生理学的異常や薬物投与による異常の誘発・改善を示している<sup>8-12)</sup>. カテコラミン誘発性多形性心室頻拍 (catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: CPVT) は運動や情動ストレスにより QRS 波形不定の心室頻拍を生じる疾患で心筋細胞での Ca<sup>2+</sup>調節機構の異常が原因と考えられており, 変異遺伝子により亜型分類されている. 疾患特異的 iPS 細胞は

Table 1 Disease-specific iPS cells model heart diseases

Disease	Subtype	Gene mutation
Long QT syndrome (LQTS)	LQT1	KCNQ1
	LQT2	KCNH2
	LQT3	SCN5A
	LQT8 (Timothy syndrome)	CACNA1C
Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT)	CPVT1	RYR2
	CPVT2	CASQ2
Dilated cardiomyopathy (DCM)		TNNT2
		LMNA
		DES
Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)		MYH7
Arrhythmogenic right ventricular dysplasia (ARVD)		PKP2
LEOPARD syndrome		PTPN11
Pompe disease		GAA
Friedreich's ataxia		Frxataxin

ryanodine receptor 2 (RYR2) の変異が原因の CPVT1 と calsequestrin 2 (cardiac muscle) (CASQ2) の変異が原因の CPVT2 患者から樹立されており、いずれの iPS 由来心筋細胞もコントロール iPS 由来心筋細胞と比較し、カテコラミン刺激による遅延後脱分極を示した<sup>13-15)</sup>。拡張型心筋症については、actin, alpha, cardiac muscle 1 (ACTC1), desmin (DES), lamin A/C (LMNA), sarcoglycan, delta (SGCD), myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, beta (MYH7), troponin T type 2 (cardiac) (TNNT2), tropomyosin 1 (alpha) (TPM1) 等の遺伝子異常が原因となりうる事が知られているが、疾患特異的 iPS 細胞は、TNNT2, LMNA, DES 変異患者からそれぞれ樹立されており、分化誘導された心筋細胞は構造異常と機能異常を認めた<sup>16-18)</sup>。肥大型心筋症は、MYH7 をはじめとした 16 種類以上の遺伝子の 900 種類以上の変異が報告されているが、疾患特異的 iPS 細胞は MYH7 変異患者より樹立されており、形態異常や Ca<sup>2+</sup> 制御機構の異常を示した<sup>19)</sup>。不整脈源性右室心筋症は、原因不明の右室心筋の変性、脂肪浸潤と線維化により、右室の拡大や収縮不全、右室起源の心室性不整脈を呈する。デスモソーム蛋白の plakophilin-2 (PKP2) の遺伝子異常が多く、疾患特異的 iPS 細胞も PKP2 の変異患者から樹立されており、心筋細胞の脂肪浸潤と Ca<sup>2+</sup> 制御異常を認めた<sup>20, 21)</sup>。LEOPARD 症候群は主に細胞内シグナル伝達経路である RAS/MAPK の構成分子である protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11 (PTPN11), Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase (RAF1), soc-2 suppressor of clear homolog (SHOC2) 異常によるが、疾患特異的 iPS 細胞は PTPN11 変異の患者から樹立されており、細胞腫大等の肥大型心筋症の表現型を示した<sup>22)</sup>。その他にも、Pompe 病、Friedreich 失調症等の疾患からも疾患特異的 iPS 細胞は樹立されている<sup>23, 24)</sup>。このように、循環器領域では主に遺伝性不整脈と家族性心筋症から

疾患特異的 iPS 細胞は樹立されており、細胞の構造異常や電気生理学的異常が *in vitro* で再現されている。

### 先天性心疾患の発生機序

近年、心臓発生を制御する転写因子群が多数同定され、その制御機構も明らかにされつつある<sup>25)</sup>。心臓特異的遺伝子の変異や関連染色体領域の異常が先天性心疾患を引き起こしうることも確認されている<sup>26)</sup>。しかしながら、遺伝性不整脈や家族性心筋症が明らかかな単一遺伝子変異を原因としうるのに対し、心臓の形態異常を伴う先天性心疾患は、大部分は孤発性であり遺伝的要因が不明なことが多い。さらに最近、心臓発生に関わる制御機構としてエピジェネティック制御が注目されている。エピジェネティック制御とは、DNA の塩基配列変化を伴わずに遺伝子発現や細胞表現型の変化をもたらす修飾制御のことであり、この異常が原因と思われる心奇形も報告されている<sup>27, 28)</sup>。このように、先天性心疾患は多数の因子が複雑に絡み合って形成されている可能性があると考えられる。

### 転写因子群の異常と先天性心疾患

心臓発生過程における分子制御機構は詳細に解明され<sup>25)</sup>、その異常により引き起こされる心臓の形成異常も報告されている<sup>26)</sup>。心臓発生には多数の転写因子群が段階的に協調して作用している。主なものとして、ホメオボックス型転写因子である NKX2-5, Zn フィンガー型転写因子の GATA4, T-ボックス型転写因子の TBX5 等が挙げられる。これらは複合体を形成し、また他の転写因子と協調して心臓発生を制御する。また左心室形成に重要な一次心臓領域では NKX2-5, HAND1 が、右心室・流出路の起源となる二次心臓領域の形成には ISL1, HAND2 が重要とされている。これら心臓転写因子群の遺伝子変異は各種心臓の形態異常を引き起こすことが確認されており、先天性心疾患患者からも検出されている (Table 2)。

Table 2 Cardiac transcription factors from the patients with congenital heart diseases

Transcription factor	Congenital heart disease	References
NKX2-5	ASD, VSD, Ebstein's anomaly, TOF, atrioventricular block	30, 31)
GATA4	ASD, TOF, pulmonary valve stenosis	32, 33)
TBX1	TOF, IAA, truncus arteriosus	34, 35)
TBX5	ASD, VSD, conduction disorder, Holt-Oram syndrome	29)
TBX20	ASD, VSD	36)
NOTCH1	VSD, TOF, MA, DORV, bicuspid aortic valve, HLHS	37)
HAND1	VSD, TOF	38, 39)

ASD, atrial septal defect; VSD, ventricular septal defect; TOF, tetralogy of fallot; IAA, interruption of aortic arch; MA, mitral atresia; DORV, double-outlet right ventricle; HLHS, hypoplastic left heart syndrome.

TBX5 は Holt-Oram 症候群の原因遺伝子として同定されており、心房中隔欠損 (ASD)、心室中隔欠損 (VSD)、伝導障害等を来たす<sup>29)</sup>。NKX2-5 の変異は ASD, VSD, エプスタイン奇形やファロー四徴症 (TOF)、房室ブロック患者等、多くの先天性心疾患で認められている<sup>30, 31)</sup>。GATA4 は NKX2-5 と共同して作用する転写因子であり、GATA4 の変異も ASD, TOF, 肺動脈弁狭窄等の複数の先天性心疾患との関与が指摘されている<sup>32, 33)</sup>。TBX1 は TOF, 総動脈管症, 大動脈弓離断症等を来たす DiGeorge 症候群で変異を認めている<sup>34, 35)</sup>。TBX20 の変異は ASD, VSD, 心室や弁の形成障害との関与が指摘されている<sup>36)</sup>。NOTCH1 は大動脈二尖弁の原因遺伝子とされており、また NOTCH1 の変異は VSD, TOF, 僧帽弁閉鎖症, 両大血管右室起始症, HLHS 患者等でも認められている<sup>37)</sup>。HAND1 の変異は VSD, TOF 等で認めている<sup>38, 39)</sup>。その他にも、複数の心臓特異的

転写因子の変異が先天性心疾患患者から同定されている。しかし、実際には大部分の患者は孤発性であり遺伝子異常も認めておらず、心臓の形態異常を伴う先天性心疾患の原因は未だに確定されていないのが現状である。

### エピジェネティック制御機構と先天性心疾患

器官発生や病態形成において、最近注目されているエピジェネティック制御は、主に DNA メチル化、ヒストン修飾酵素、そしてクロマチン・リモデリング複合体による修飾に分類される。これらの制御機構は、単独か各種転写因子と協調して DNA の配列変化を伴うことなく遺伝子の発現を調節し、発生過程における細胞の表現型の決定や、各種細胞の維持に寄与している。エピジェネティック制御は心臓発生にも大きく関与していることが明らかにされつつあり、マウス等による実験では、これらエピジェネティック制御の異常

Table 3 Heart anomaly caused by histone modifying enzymes

Type	Enzyme	Modification	Anomaly	References
Class I HDAC	Hdac1, 2	Both Hdac1 and Hdac2 deletion in the myocardium	Dilated cardiomyopathy, atthymia	40)
Class II HDAC	Hdac5, 9	Both Hdac5 and Hdac9 deletion in germline	VSD	41)
	Hdac7	Deletion in germline in mice Silenced in the endothelium	Vascular abnormality Altered endothelial morphology, migration and structure	42) 43)
Class III HDAC	Sirt1	Germline deletion	ASD, VSD, abnormal atrioventricular valves	44)
HAT	p300	Mutation which erases HAT activity	ASD, VSD	45)
Histone demethylase HMT	Jumonji	Germline deletion	DORV, hypertrabeculation	46)
	Smyd1	Germline deletion	Ventricular hypoplasia	47)
	Whsc1	Germline deletion	ASD, VSD	48)

Table 4 Heart anomaly related to The ATP-dependent chromatin-remodeling complexes

Type	Enzyme	Modification	Anomaly	References
SWI/SNF	Brg1	Deletion in the endocardium	Loss of cardiac jelly leading hypotrabeculation	52)
		Deletion in the myocardium	VSD	53)
		Deletion in the secondary heart field	Hypoplastic outflow tract and right ventricle	53)
		Mutation in endothelium in mice	Abnormal vascular remodeling in yolk sac	50)
		Deletion in smooth muscle cells in mice	Persistent ductus arteriosus (PDA)	51)
	Baf60c	Knockdown in mouse embryo	Impaired secondary heart field formation	54)
Baf180	Germline deletion	Hypoplastic ventricle, VSD, coronary vessel defects	55, 56)	

による心奇形の発生が確認されている (Table 3, 4).

### 1. ヒストン修飾酵素の異常

ヒストンは、メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化を受けることが知られており、それらの化学修飾により遺伝子発現の変化等をもたらされる。これらの変化を引き起こすヒストン修飾酵素として、ヒストンメチルトランスフェラーゼ (HMT)、ヒストン脱メチル化酵素、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT)、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 等が知られている。マウス実験等の結果からは、この酵素異常と心奇形発生との関与が報告されている (Table 3)。Class I HDAC に分類される Hdac1 と Hdac2 が心筋内で同時に欠如すると不整脈や拡張型心筋症を引き起こす<sup>40)</sup>。Class II HDAC である Hdac5 と Hdac9 が同時に欠失すると、VSD や心筋の菲薄化を引き起こす<sup>41)</sup>。また Hdac7 の欠如は血管形成異常を来し<sup>42)</sup>、内皮細胞での Hdac7 発現消失は、内皮細胞の形態や毛細管形成等を傷害する<sup>43)</sup>。Class III HDAC である Sirt1 が欠失すると、ASD、VSD、弁の欠損等を来す<sup>44)</sup>。アセチル化酵素複合体を形成する p300 遺伝子に変異し HAT 活性を失うと、ASD、VSD、冠血管形成不全等を来す<sup>45)</sup>。ヒストン脱メチル化酵素を形成する Jarid2/Jumonji が欠失すると、両大血管右室起始や心筋の過剰肉柱形成を引き起こす<sup>46)</sup>。HMT については、Smyd1 が欠失すると、心室低形成を引き起こし<sup>47)</sup>、Wolf-Hirschhorn syndrome candidate (WHSC1) 遺伝子の異常は Wolf-Hirschhorn 症候群と関連しており、ASD、VSD を来す<sup>48)</sup>。ASD、VSD、大動脈縮窄等の心臓形成異常を合併することがある Kabuki 症候群患者からは、HMT に関与する MLL2 の変異が確認されている<sup>49)</sup> (Table 3)。

### 2. クロマチン・リモデリング複合体の異常

クロマチン・リモデリング複合体は、中心となる ATPase サブユニットを指標に SWI/SNF, ISWI, CHD, INO80 複合体の 4 つのサブファミリーに分類される。SWI/SNF 複合体のコア因子である Brg1 は、内皮細胞で欠失すると *yolk sac* の血管形成異常を来し<sup>50)</sup>、平滑筋細胞内の Brg1 が欠失すると、動脈管開存を引き起こすことがある<sup>51)</sup>。また、Brg1 発現が心内膜で消失すると、Adamts1 遺伝子の制御ができず心臓ゼリーの消失と肉柱形成不全を来し<sup>52)</sup>、心筋で欠失すると VSD を来す<sup>53)</sup>。さらに二次心臓領域の心筋前駆細胞内で欠失すると、右室と右室流出

路の形成不全をもたらす<sup>53)</sup>。BAF 複合体メンバーの Baf60c をコードする遺伝子である Smarcd3 のノックダウンマウスでは、outflow tract の異常を伴う単心室を来す等、心臓形成不全を認める<sup>54)</sup>。同じく BAF 複合体メンバーの Baf180 欠失マウスでは、冠血管の形成不全<sup>55)</sup>、心室低形成や VSD を引き起こす<sup>56)</sup> (Table 4)。

### 3. エピジェネティック修飾と心臓特異的転写因子発現

前述したヒストン修飾酵素やクロマチン・リモデリング複合体の中には、心臓特異的転写因子と直接相互作用するものもある。Brg1 は Serum response factor (SRF) の co-activator である Myocardin-related transcription factor A (MRTFA) と相互作用することで平滑筋遺伝子の発現を制御し<sup>57)</sup>、また Nkx2-5, Tbx5, Tbx20 と容量依存性に相互作用する<sup>58)</sup>。Hdac2 は Hop と協同して Gata4 の転写活性を抑制するのに対し<sup>59)</sup>、p300 は Gata4 のアセチル化を促進することで Gata4 の DNA 結合活性と転写活性を高める<sup>60)</sup>。Jarid2 は心内膜での Notch1 とその下流の転写因子である Nrg1 の発現を抑制する<sup>61)</sup>。ポリコム抑制複合体 1 の一員である Rae28 は、Nkx2.5 の発現に必須であり<sup>62)</sup>、また Whsc1 もまた Nkx2.5 と協同し心臓発生を制御する<sup>48)</sup>。これら主にマウス実験の知見から、心臓発生過程におけるエピジェネティック制御の関与が少しずつ明らかにされつつあり、また異常なエピジェネティック制御が心臓発生異常に関与している可能性が示唆されている。

### HLHS 由来疾患特異的 iPS 細胞の解析

このように、先天性心疾患はジェネティックとエピジェネティックの要因が複雑に絡み合った病態発生機序をとっている可能性がある。それゆえに、主に単一遺伝子をノックアウトすることで作成するモデル動物では先天性心疾患の疾患モデルとしては不十分なことが多く、先天性心疾患の病態解明が進まない原因となっている。疾患特異的 iPS 細胞についても、単一遺伝子変異が原因とはいえない、かつ心臓の構造異常を伴う先天性疾患からは樹立されてこなかった。しかし、iPS 細胞は分化誘導させることで発生過程を *in vitro* で再現することができ、病態発生過程での分子制御機構を研究することが可能となる。疾患特異的 iPS 細胞の分化誘導過程を多角的に解析することで、複雑な病態発生機構を持つ疾患に対しても、その病態解明に迫ることができる可能性がある (Fig. 1)。

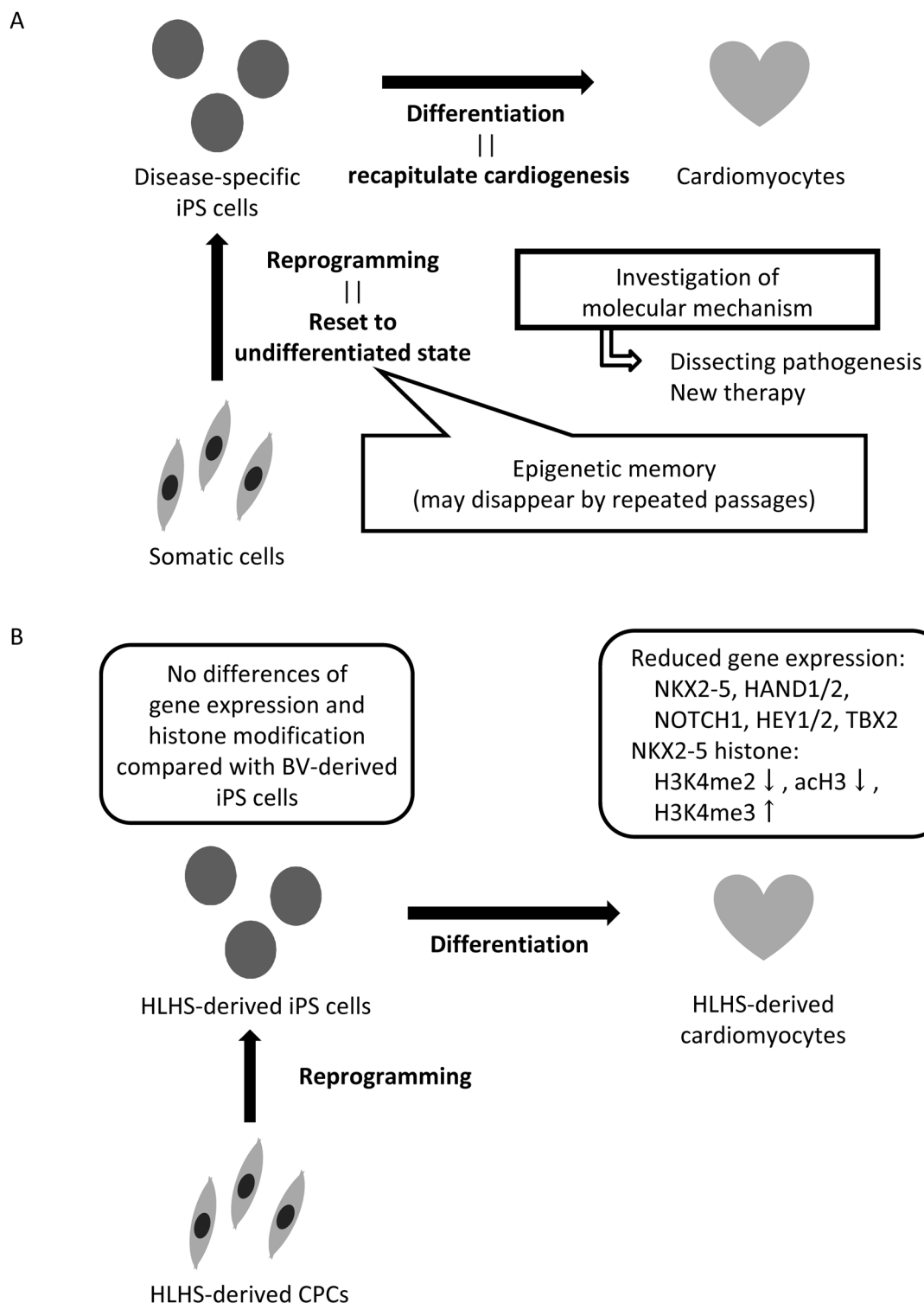


Fig. 1 Disease-specific iPS cells as *in vitro* models of congenital heart diseases

(A) Somatic cells from patients were initially reprogrammed to undifferentiated cells that have not yet acquired the full disease phenotype. Generated disease-specific iPS cells could give rise to cardiomyocytes to recapitulate the disease phenotype. Investigation of the molecular insights during differentiation might dissect the developmental pathogenesis of congenital heart diseases. (B) Gene expression and histone modification were comparable between HLHS- and biventricle (BV) heart-derived iPS cells. Upon differentiation, HLHS-iPS-derived cardiomyocytes exhibited combinatorial transcriptional repression and altered histone modification of *NKX2-5* compared with those from BV-iPS-derived cardiomyocytes.

我々は HLHS 患者から疾患特異的 iPS 細胞を樹立し解析をすることを試みた。HLHS 患者の術中心臓余剰組織から、心臓前駆細胞 (CPCs) を精製分離して疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、心筋分化誘導過程における分子制御機構を検討した<sup>7)</sup>。まず、定量 RT-PCR で心臓特異的転写因子群の発現を継時的に検討した。すると、HLHS-iPS 細胞由来心筋細胞は、二心室 (BV) 心由来コントロール細胞と比較し、一次心臓領域の形成に必須である NKX2-5, HAND1, HAND2, 左室流入路と流出路形成, 房室管形成, そして弁形成に重要な NOTCH1, HEY1, HEY2, TBX2 の発現上昇が著明に抑制されていることが明らかになった。これらの転写因子のうち、NKX2-5, HAND1, NOTCH1 について詳細に検討したところ、患者検体のいずれにも遺伝子変異はなく、また HLHS 由来 iPS 細胞と CPCs の心臓特異的プロモーター活性の検討では、HLHS 由来細胞では BV 由来細胞と比較し、Serum response element, TNNT2, NPPA のプロモーター活性が著明に低下しており、NKX2-5, HAND1, NOTCH1 の導入がプロモーター活性の改善に寄与していた。さらに、クロマチン免疫沈降法を用いて iPS 細胞, CPCs, iPS 細胞由来心筋細胞について、HLHS 由来と BV 由来コントロール細胞の NKX2-5 プロモーター領域のヒストン修飾を検討したところ、iPS 細胞と CPCs ではヒストン修飾に有意差は認めなかったものの、iPS 細胞由来心筋細胞においては、BV 由来に比較し HLHS 由来の細胞で NKX2-5 プロモーター領域の dimethylated histone H3-lysine 4 (H3K4me2) と acetylated histone H3 (acH3) の低下と trimethylated histone H3-lysine 27 (H3K27me3) の上昇を認めた。このように、疾患特異的 iPS 細胞の分化誘導過程を検討した結果から、HLHS の病態発生には NKX2-5, HAND1, NOTCH1 は必須の転写因子であり、またヒストン修飾の異常による NKX2-5 の転写活性低下が関与している可能性が示唆された。Jiang らも、HLHS 患者より疾患特異的 iPS 細胞を樹立し解析した<sup>6)</sup>。分化誘導して得られた拍動性の胚様体は、HLHS 由来のものではヒト胚性幹 (ES) 細胞とコントロール iPS 細胞由来のものに比較し少数で、拍動数も少ないものが多かった。心筋分化誘導過程における定量 RT-PCR では、HLHS 由来 iPS 細胞はヒト ES 細胞とコントロール iPS 細胞と比較し、心臓特異的転写因子である MESP1 と心筋構造タンパクの TNNT2 の上昇が著明に抑制され、また GATA4 が遅れて上昇することを示した。また HLHS-iPS 由来心筋細胞ではカフェイン添加下でカルシウム振動の出現

を認め、リアノジンレセプターの傷害も示唆された。

### 先天性心疾患研究における 疾患特異的 iPS 細胞の課題

これまで循環器領域の疾患特異的 iPS 細胞は、単一遺伝子変異が原因となる遺伝性不整脈や家族性心筋症患者などから樹立されてきた。これらの iPS 細胞から分化誘導して得られた心筋細胞は、電気生理学的ないし細胞の構造的な異常を示すことに成功し、疾患モデルになりうると考えられた。しかし先天性心疾患については、その原因が明らかではなく、iPS 細胞による疾患モデルの作成は困難であると考えられてきた。ただ、iPS 細胞をはじめとした多能性幹細胞では、分化誘導することで発生過程を *in vitro* で再現することができるため、継時的に分子制御機構を検討することが可能となる。よって疾患特異的 iPS 細胞では、病態発生過程における分子制御機構を継時的かつ網羅的に解析することができるため、多数の因子が複雑に関与していることが予測される先天性心疾患の病態発生機序の解明には、有用である可能性がある。しかしながら、iPS 細胞を先天性心疾患の疾患モデルとして使用するには、いくつか考慮すべき点がある。まず、先天性心疾患は基本的には心臓や血管の構造異常であり、単一の細胞種の異常ではないということである。iPS 細胞を心筋分化誘導して得られる細胞は心筋細胞であり、心筋分化誘導して得られた心筋細胞だけの検討では、心臓や血管の構造全体の異常についての正確な病態解明は難しいと考えられる。ただ、平滑筋細胞や内皮細胞といった他細胞種への分化誘導も併用して複数種の細胞について継時的に解析することで、より精度の高い研究ができる可能性がある。次に、エピジェネティックメモリーに注意する必要がある。エピジェネティックメモリーとは、DNA 塩基配列以外の体細胞の性質が、樹立後の iPS 細胞にも受け継がれるという iPS 細胞に特有の性質であり、主に DNA メチル化を中心としたものである。これにより、樹立した iPS 細胞は分化誘導した際に、もとの体細胞種に分化しやすくその他の細胞種へは分化しづらいという性質を持っている。よって、遺伝子変異以外の遺伝子発現量の変化やエピジェネティック制御機構の変化を原因とする疾患の場合には、その使用に注意を要する。しかし、エピジェネティックメモリーは iPS 細胞を繰り返し継代することで消失するという報告も多く<sup>63, 64)</sup>、研究デザインの工夫により克服できる可能性がある。

## 結 語

iPS細胞が発表されて以来、新しい疾患モデルとして疾患特異的 iPS細胞が注目されるようになった。しかし、循環器領域での疾患特異的 iPS細胞は主に遺伝性不整脈と家族性心筋症といった単一遺伝子変異が原因となる疾患から樹立され、疾患モデルとされており、心臓の構造異常を伴う先天性心疾患からは樹立されてこなかった。近年、心臓転写因子群が同定され、心臓発生の分子制御機構が次第に明らかにされつつある<sup>25)</sup>。これにより、先天性心疾患に関連した遺伝子異常や染色体異常も知られるようになった<sup>26)</sup>。しかしながら、先天性心疾患の多くは孤発性であり、その原因は依然不明なものが多い。また複数の心臓転写因子の発現異常やエピジェネティック制御機構の異常など、要因が複雑に絡み合って病態が形成されている可能性がある。このような場合にも、発生過程を *in vitro* で再現することのできる疾患特異的 iPS細胞は有用である可能性がある。ただし、疾患特異的 iPS細胞には、複数の細胞種が形成に関与する器官異常の病態解明には限界があること、また iPS細胞特有のエピジェネティックメモリーの問題があることから、先天性心疾患の疾患モデルとするにはさらなる検討が必要である。しかし、動物モデルの作成が困難であった先天性心疾患の病態解明に、疾患特異的 iPS細胞は新たな転機をもたらす可能性があり、今後の研究が大いに期待される。

## 引用文献

- 1) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; **126**: 663–676
- 2) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; **131**: 861–872
- 3) Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al: Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; **318**: 1917–1920
- 4) Sallam K, Kodo K, Wu JC: Modeling inherited cardiac disorders. *Circ J* 2014; **78**: 784–794
- 5) Zanella F, Lyon RC, Sheikh F: Modeling heart disease in a dish: From somatic cells to disease-relevant cardiomyocytes. *Trends Cardiovasc Med* 2014; **24**: 32–44
- 6) Jiang Y, Habibollah S, Tilgner K, et al: An induced pluripotent stem cell model of hypoplastic left heart syndrome (HLHS) reveals multiple expression and functional differences in HLHS-derived cardiac myocytes. *Stem Cells Transl Med* 2014; **3**: 416–423
- 7) Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, et al: Directed differentiation of patient-specific induced pluripotent stem cells identifies the transcriptional repression and epigenetic modification of NKX2-5, HAND1, and NOTCH1 in hypoplastic left heart syndrome. *PLoS ONE* 2014; **9**: e102796
- 8) Itzhaki I, Maizels L, Huber I, et al: Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; **471**: 225–229
- 9) 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
- 10) 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
- 11) Terrenoire C, Wang K, Tung KW, et al: Induced pluripotent stem cells used to reveal drug actions in a long QT syndrome family with complex genetics. *J Gen Physiol* 2013; **141**: 61–72
- 12) Yazawa M, Hsueh B, Jia X, et al: Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome. *Nature* 2011; **471**: 230–234
- 13) Fatima A, Xu G, Shao K, et al: In vitro modeling of ryanodine receptor 2 dysfunction using human induced pluripotent stem cells. *Cell Physiol Biochem* 2011; **28**: 579–592
- 14) Itzhaki I, Maizels L, Huber I, et al: Modeling of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia with patient-specific human-induced pluripotent stem cells. *J Am Coll Cardiol* 2012; **60**: 990–1000
- 15) Novak A, Barad L, Zeevi-Levin N, et al: Cardiomyocytes generated from CPVTD307H patients are arrhythmogenic in response to beta-adrenergic stimulation. *J Cell Mol Med* 2012; **16**: 468–482
- 16) Siu CW, Lee YK, Ho JC, et al: Modeling of lamin A/C mutation premature cardiac aging using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Aging (Albany, NY Online)* 2012; **4**: 803–822
- 17) Sun N, Yazawa M, Liu J, et al: Patient-specific induced pluripotent stem cells as a model for familial dilated cardiomyopathy. *Sci Transl Med* 2012; **4**: 130ra147
- 18) Tse HF, Ho JC, Choi SW, et al: Patient-specific induced-pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes recapitulate the pathogenic phenotypes of dilated cardiomyopathy due to a novel DES mutation identified by whole exome sequencing. *Hum Mol Genet* 2013; **22**: 1395–1403
- 19) Lan F, Lee AS, Liang P, et al: Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2013; **12**: 101–113
- 20) Kim C, Wong J, Wen J, et al: Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. *Nature* 2013; **494**: 105–110
- 21) Ma D, Wei H, Lu J, et al: Generation of patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as a cellular model of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2013; **34**: 1122–1133
- 22) Carvajal-Vergara X, Sevilla A, D'Souza SL, et al: Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature* 2010; **465**: 808–812
- 23) Hick A, Wattenhofer-Donze M, Chintawar S, et al: Neurons and cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells as a model for mitochondrial defects in



- Friedreich's ataxia. *Dis Model Mech* 2013; **6**: 608–621
- 24) Huang HP, Chen PH, Hwu WL, et al: Human Pompe disease-induced pluripotent stem cells for pathogenesis modeling, drug testing and disease marker identification. *Hum Mol Genet* 2011; **20**: 4851–4864
  - 25) Olson EN: Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science* 2006; **313**: 1922–1927
  - 26) Bruneau BG: The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature* 2008; **451**: 943–948
  - 27) Chang CP, Bruneau BG: Epigenetics and cardiovascular development. *Annu Rev Physiol* 2012; **74**: 41–68
  - 28) Han P, Hang CT, Yang J, et al: Chromatin remodeling in cardiovascular development and physiology. *Circ Res* 2011; **108**: 378–396
  - 29) Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, et al: Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat Genet* 1997; **15**: 30–35
  - 30) Benson DW, Silberbach GM, Kavanaugh-McHugh A, et al: Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. *J Clin Invest* 1999; **104**: 1567–1573
  - 31) Schott JJ, Benson DW, Basson CT, et al: Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science* 1998; **281**: 108–111
  - 32) Yang YQ, Gharibeh L, Li RG, et al: GATA4 loss-of-function mutations underlie familial tetralogy of fallot. *Hum Mutat* 2013; **34**: 1662–1671
  - 33) Xiang R, Fan LL, Huang H, et al: A novel mutation of GATA4 (K319E) is responsible for familial atrial septal defect and pulmonary valve stenosis. *Gene* 2014; **534**: 320–323
  - 34) Lindsay EA, Vitelli F, Su H, et al: Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature* 2001; **410**: 97–101
  - 35) Merscher S, Funke B, Epstein JA, et al: TBX1 is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. *Cell* 2001; **104**: 619–629
  - 36) Kirk EP, Sunde M, Costa MW, et al: Mutations in cardiac T-box factor gene TBX20 are associated with diverse cardiac pathologies, including defects of septation and valvulogenesis and cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 2007; **81**: 280–291
  - 37) Garg V, Muth AN, Ransom JF, et al: Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature* 2005; **437**: 270–274
  - 38) Cheng Z, Lib L, Li Z, et al: Two novel HAND1 mutations in Chinese patients with ventricular septal defect. *Clin Chim Acta* 2012; **413**: 675–677
  - 39) Wang J, Lu Y, Chen H, et al: Investigation of somatic NKX2-5, GATA4 and HAND1 mutations in patients with tetralogy of Fallot. *Pathology* 2011; **43**: 322–326
  - 40) Montgomery RL, Davis CA, Potthoff MJ, et al: Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility. *Genes Dev* 2007; **21**: 1790–1802
  - 41) Chang S, McKinsey TA, Zhang CL, et al: Histone deacetylases 5 and 9 govern responsiveness of the heart to a subset of stress signals and play redundant roles in heart development. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 8467–8476
  - 42) Chang S, Young BD, Li S, et al: Histone deacetylase 7 maintains vascular integrity by repressing matrix metalloproteinase 10. *Cell* 2006; **126**: 321–334
  - 43) Mottet D, Bellahcene A, Pirotte S, et al: Histone deacetylase 7 silencing alters endothelial cell migration, a key step in angiogenesis. *Circ Res* 2007; **101**: 1237–1246
  - 44) Cheng HL, Mostoslavsky R, Saito S, et al: Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 10794–10799
  - 45) Shikama N, Lutz W, Kretzschmar R, et al: Essential function of p300 acetyltransferase activity in heart, lung and small intestine formation. *EMBO J* 2003; **22**: 5175–5185
  - 46) Takeuchi T, Kojima M, Nakajima K, et al: Jumonji gene is essential for the neurulation and cardiac development of mouse embryos with a C3H/He background. *Mech Dev* 1999; **86**: 29–38
  - 47) Park CY, Pierce SA, von Drehle M, et al: skNAC, a Smyd1-interacting transcription factor, is involved in cardiac development and skeletal muscle growth and regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 20750–20755
  - 48) Nimura K, Ura K, Shiratori H, et al: A histone H3 lysine 36 trimethyltransferase links Nkx2-5 to Wolf-Hirschhorn syndrome. *Nature* 2009; **460**: 287–291
  - 49) Ng SB, Bigham AW, Buckingham KJ, et al: Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat Genet* 2010; **42**: 790–793
  - 50) Griffin CT, Brennan J, Magnuson T: The chromatin-remodeling enzyme BRG1 plays an essential role in primitive erythropoiesis and vascular development. *Development* 2008; **135**: 493–500
  - 51) Zhang M, Chen M, Kim JR, et al: SWI/SNF complexes containing Brahma or Brahma-related gene 1 play distinct roles in smooth muscle development. *Mol Cell Biol* 2011; **31**: 2618–2631
  - 52) Stankunas K, Hang CT, Tsun ZY, et al: Endocardial Brg1 represses ADAMTS1 to maintain the microenvironment for myocardial morphogenesis. *Dev Cell* 2008; **14**: 298–311
  - 53) Hang CT, Yang J, Han P, et al: Chromatin regulation by Brg1 underlies heart muscle development and disease. *Nature* 2010; **466**: 62–67
  - 54) Lickert H, Takeuchi JK, Von Both I, et al: Baf60c is essential for function of BAF chromatin remodeling complexes in heart development. *Nature* 2004; **432**: 107–112
  - 55) Huang X, Gao X, Diaz-Trelles R, et al: Coronary development is regulated by ATP-dependent SWI/SNF chromatin remodeling component BAF180. *Dev Biol* 2008; **319**: 258–266
  - 56) Wang Z, Zhai W, Richardson JA, et al: Polybromo protein BAF180 functions in mammalian cardiac chamber maturation. *Genes Dev* 2004; **18**: 3106–3116
  - 57) Zhang M, Fang H, Zhou J, et al: A novel role of Brg1 in the regulation of SRF/MRTFA-dependent smooth muscle-specific gene expression. *J Biol Chem* 2007; **282**: 25708–25716
  - 58) Takeuchi JK, Lou X, Alexander JM, et al: Chromatin remodeling complex dosage modulates transcription factor function in heart development. *Nat Commun* 2011; **2**: 187
  - 59) Trivedi CM, Zhu W, Wang Q, et al: Hopx and Hdac2 interact to modulate Gata4 acetylation and embryonic cardiac myocyte proliferation. *Dev Cell* 2010; **19**: 450–459
  - 60) Yanazume T, Hasegawa K, Morimoto T, et al: Cardiac p300 is involved in myocyte growth with decompensated

- 
- heart failure. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 3593–3606
- 61) Mysliwiec MR, Bresnick EH, Lee Y: Endothelial *Jarid2/Jumonji* is required for normal cardiac development and proper *Notch1* expression. *J Biol Chem* 2011; **286**: 17193–17204
- 62) Shirai M, Osugi T, Koga H, et al: The Polycomb-group gene *Rae28* sustains *Nkx2.5/Csx* expression and is essential for cardiac morphogenesis. *J Clin Invest* 2002; **110**: 177–184
- 63) Polo JM, Liu S, Figueroa ME, et al: Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2010; **28**: 848–855
- 64) Sanchez-Freire V, Lee AS, Hu S, et al: Effect of human donor cell source on differentiation and function of cardiac induced pluripotent stem cells. *J Am Coll Cardiol* 2014; **64**: 436–448