

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15049

研究課題名(和文)「心臓チャネル病」の核酸医療の動物モデルでのproof-of-concept

研究課題名(英文) Proof-of-concept of nucleic acid medicine for cardiac channelopathy in an animal model

研究代表者

古川 哲史 (Furukawa, Tetsushi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：80251552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：心臓チャネル病は、家族性突然死症候群の主要な原因であり、有効な治療法がないことから新たな治療戦略の確立が望まれている。マウスで遺伝子獲得変異を導入することで心臓チャネル病の動物モデルを構築し、新たな治療法の確立を目指した。当初の計画では、機能獲得遺伝子に対する核酸医薬品を用いた治療を行うことを予定していたが、核酸医薬品が肝臓に主に取り込まれこれによる副作用が回避できないことから、Crispr/Cas9と呼ばれるゲノム編集技術を利用することに計画を変更した。Crispr/Cas9の心臓への導入、心筋細胞でのゲノムの改変、心筋細胞イオンチャネル機能の修飾が可能となった。

研究成果の概要(英文)：Cardiac channelopathy is a main cause of familiar sudden death; because of lack of efficient therapy, the establishment of novel therapeutic strategy is warranted. I have established an animal model of cardiac channelopathy by introducing gain-of-function mutant, with use of which I tried to establish a novel therapeutic strategy of cardiac channelopathy. Originally, I planned to reduce gain-of-function mutant gene using oligonucleic acid. However, oligonucleic acid was mainly introduced into the liver, causing liver toxicity as a side action. Then, I changed our plan to use Crispr/Cas9 genome editing strategy. I was succeeded in introducing Crispr/Cas9 vector into cardiomyocytes, genome editing in cardiac myocytes, and modulating cardiac ion channel function.

研究分野：循環器内科

キーワード：不整脈

1. 研究開始当初の背景

「遺伝子治療」は 1990 年アメリカでアデノシンデアミナーゼ欠損症に対してアデノウイルスベクターを用いて行われたのが最初である。我が国でも 1995 年同疾患に対して同様のベクターを使って遺伝子治療が行われ、多くの難治性疾患治療の切り札としての期待が集まった。ところが、臨床治験においてアデノウイルスベクターによる副作用で複数の死亡者が出たことから、推進が大幅に遅れ、その後登場した再生医療にとって代わられた。ところが、時間とともにウイルスベクターの改良が進み、2012 年ごろから欧米では遺伝子治療が再び脚光を浴びてきている。一方、我が国では遺伝子治療の試みは極めて少ない。特に、心臓疾患での試みはほとんどなされていないのが現状であった。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて、心臓疾患、特に表現型がはっきりしており、アッセイ系も確立している心臓チャンネル病を対象に、モデルマウスを作成し、マウスで遺伝子治療の proof-of-concept を得ることを研究目的とした。近年東京医科歯科大学では横田隆徳博士によりヘテロ核酸による遺伝子治療が開発されたこともあり、まずはヘテロ核酸を用いた試みを行うこととした。リスクマネジメントとして、ヘテロ核酸がうまくいかなかった場合は、近年普及してきた CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集を用いて試みることとした。

3. 研究の方法

治療を行う上では、gain-of-function 変異が好ましいと考えられたことから、QT 短縮症候群で見られる KCNJ2 の塩基 G514A(アミノ酸 D172N)を導入したマウスを CRISPR/Cas9 システムで作成する。

ヘテロ核酸は、主に肝臓に取り込まれまだ心臓への取り込みの効率は悪いことから、心臓への取り込みを増やす positive selection により心臓を試みる。

もしこれがうまくいかない場合は、KCNJ2 をロックアウトする CRISPR/Cas9 を作成して、これを in vivo で心臓に導入することにより KCNJ2 抑制を行う。心臓への導入としては、直接心筋注射および静脈注射の両方を試みる。

4. 研究成果

(1)心臓チャンネル病モデルマウスの作製

KCNJ2 の塩基 G514A(アミノ酸 D172N)を導入したマウスを CRISPR/Cas9 システムで作成した。作成したマウスは、QT 時間が短縮していること、電気刺激により心室性不整脈の誘発率が上昇していることが確認された。これらにより、QT 短縮症候群モデルマウスを確立することができたと考えた。

(2)ヘテロ核酸導入

心臓特異的ペプチドを添加したヘテロ核酸を作製し、心臓への取り込みの向上を目指した。心臓への取り込みは若干向上し、肝臓への取り込みも若干減少したが、もとのヘテロ核酸の取り込みの肝臓：心臓が極めて大きいことから、この程度の改善では十分な心臓への作用を得る量のヘテロ核酸では肝障害が強くて使えなかった。もう一つの方策として、肝臓への取り込みを抑える negative selection を合わせることが考えられる。これはヘテロ核酸開発者の横田博士が試みており、この結果を待って再度チャレンジすることとした。本研究計画の申請期間の 2 年では確立は難しいことから、代替として予定していたゲノム編集法に取り組むこととした。

(3)ゲノム編集による KCNJ2 の抑制

KCNJ2 の機能抑制は、自動能の出現により確認することができる。そこで、房室ブロックを作製し、自動能が出現するか否かで、KCNJ2 の機能抑制、すなわち CRISPR/Cas9 の効率を確認することとした。Invitro 系で KCNJ2 発現を抑制することを確認した。ガイド RNA は 4 種類作成したが、そのうち最もよく成功効率が良かった 1 つのガイド RNA を in vivo で用いることとした。最初心筋への直接注射を行い、CRISPR/Cas9 により自動能が出現するが(図 1 下) vehicle 投与では自動能が出現しなかった(図 1 上)。

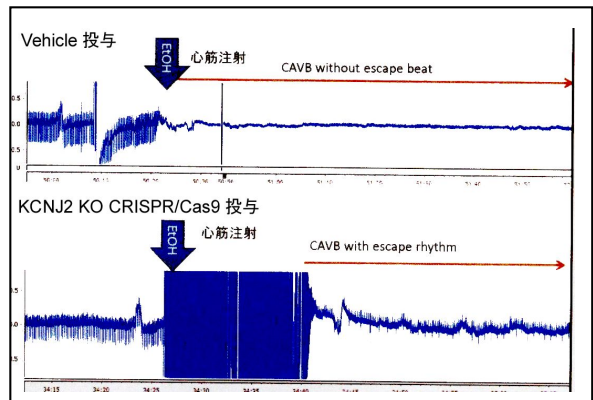


図 1. KCNJ2 KO CRISPR/Cas9 による自動能出現

次に、静脈注射で試みたが、静脈注射では心臓への導入効率が極めて低いことから、ウイルスベクターを用いた投与方法を試みることとした。心臓に比較的特異的に導入されるアデノウイルス随伴ベクター-9(AAV9)システムをペンシルベニア大学から供与いただいた。ウイルスベクターへの搭載が可能となる CRISPR/Cas9 システムとして CRISPR/SaCas9 システムが開発されているので、これにシステムを変更した。心筋への直接筋注と静脈注射の導入効率を LacZ システムを使って比較すると、心筋直接注射に劣らない導入効率を得られた(図 2)。そこで、これを使って房室

ブロックマウスで自動能の出現を検討したところ、自動能の出現が KCNJ2 KO CRISPR/SaCas9 導入マウスでのみで見られることが明らかとなった。



図 2. LacZ 用いた遺伝子導入効率の比較

iv: 静脈注射

icm: 心筋直接注射

PBSiv: 比較としてのリン酸バッファの静脈注射

以上から、心臓チャネル病モデルマウスの作製に成功し、CRISPR/SaCas9 システムを用いることにより、標的となる KCNJ2 の機能抑制が静脈注射で達成できることまでを明らかにすることができた。ヘテロ核酸で成功せず、ゲノム編集技術のアプローチ法を変更したこと、AAV9 システムの海外からの導入に時間をと要したこと、実際の心臓チャネル病での効果を検討するところまでいかなかったが、その準備段階までは進むことができた。今後、モデルマウスに KCNJ2 KO CRISPR/SaCas9 を導入することにより QT 短縮の改善がみられるか、不整脈誘発率を抑制することができるかを検討することを予定している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 17 件)

1. Kawabata M, Yokoyama Y, Sasaki T, Tao S, Ihara K, Shirai Y, Sasano T, Goya M, Furukawa T, Isobe M, Hirao K. Severe istrogenic bradycardiac related to the combined use of beta-blocking agents and sodium channel blockers. *J. Clin. Pharmacol.* 2015;7:29-36.
2. Okada J, Yoshinaga T, Kurokawa J, Washio T, Furukawa T, Sawada K, Sugiura S, Hisada T. Screening system for drug-induced arrhythmogenic risk combining a patch clamp and heart simulator. *Sci. Advance* 2015;1:e1400142
3. Kurokawa J, Sasano T, Kodama M, Li M, Ebana Y, Harada N, Honda S, Nakaya H, Furukawa T. Aromatase knockout mice reveal an impact of estrogen on

drug-induced alteration of murine electrocardiography parameters. *J. Toxicol. Sci.* 2015;40:339-348.

4. Yamakawa H, Muraoka N, Miyamoto K, Sadahiro T, Isomi M, Haginiwa S, Kojima H, Umei T, Akiyama M, Kuishi Y, Kurokawa J, Furukawa T, Fukuda K, Ieda M. Fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factor promote cardiac reprogramming under defined conditions. *Stem Cell Reports* 2015;5:1128-1142.
5. Saito Y, Nakamura K, Yoshida M, Sugiyama H, Ohe T, Kurokawa J, Furukawa T, Takano M, Nagase S, Morita H, Kusano KF, Ito H. Enhancement of spontaneous activity by HCN4 overexpression in mouse embryonic stem cell-derived cardiomyocytes - A possible biological pacemaker. *PLoS ONE* 2015;10:e0318193.
6. Yoshioka S, Usami T, Kikuta J, Ishii M, Sasano T, Sugiyama K, Furukawa T, Nakasho E, Takayanagi H, Tedder T, Karasuyama H, Kiyawami A, Adachi T. Intravital imaging of Ca²⁺ signals in lymphocytes of Ca²⁺ biosensor transgenic mice: indication of autoimmune diseases before the pathological onset. *Sci. Rep.* 2016:18738.
7. Takahashi K, Sasano T, Sugiyama K, Kurokawa J, Tamura N, Soejima Y, Sawabe M, Isobe M, Furukawa T. High-fat diet increases vulnerability to atrial arrhythmia by conduction disturbance via miR-27b. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2016;90:38-46.
8. Sugiyama K, Sasano T, Kurokawa J, Takahashi K, Okamura T, Kato N, Isobe M, Furukawa T. Oxidative stress induced ventricular arrhythmia and impairment of cardiac function in *Nos1ap* deleted mice. *Intern. Heart J.* 2016;57(3):341-349.
9. Koizumi A, Sasano T, Kimura W, Miyamoto Y, Aiba T, Ishikawa T, Nogami A, Fukamizu S, Sakurada H, Takahashi Y, Nakamura H, Ishikura T, Koseki H, Arimura T, Kimura A, Hirao K, Isobe M, Shimizu W, Miura N, Furukawa T. Genetic defects in a His-Purkinje system transcription factor, IRX3, cause lethal cardiac arrhythmias. *Eur. Heart J.* 2016;37(18):1469-1475.
10. Lopez-Redondo F, Kurokawa J, Nomura F, Kaneko T, Hamada T, Furukawa T, Yasuda K. A distribution analysis of action potential parameters obtained from patch-clamped human stem cell-derived cardiomyocytes. *J. Pharmacol. Sci.*

- 2016;131(2):141-145.
11. Kimura Y, Aiba T, Sasano T, Furukawa T, Kusano K, Shimizu W. IRX3 variant as a modifier of Brugada syndrome with frequent ventricular fibrillation. *Heart Rhythm Case Report* 2016 (in press).
 12. Hasegawa Y, Hamada S, Nishimura T, Sasaki T, Ebana Y, Kawabata M, Goya M, Isobe M, Koyama T, Furukawa T, Hirao K, Sasano T. Novel dielectric coagulation identifies hypercoagulability in patients with a high CHADS2 score without atrial fibrillation. *PLoS One* 2016;11:e0156557.
 13. Okata S, Yuasa S, Suzuki T, Ito S, Makita N, Yoshida T, Li M, Kurokawa J, Seki T, Egashira T, Aizawa Y, Kodaira M, Motoda C, Yozu G, Shimojima M, Hayashiji N, Hashimoto H, Kuroda Y, Tanaka A, Murata M, Aiba T, Shimizu W, Horie M, Kamiya K, Furukawa T, Fukuda K. Embryonic type Na⁺ channel β -subunit, *SCN3B* masks the disease phenotype of Brugada syndrome. *Sci. Rep* 2016;6:34198
 14. Liu L, Ebana Y, Nitta J, Takahashi Y, Miyazaki S, Tanaka T, Komura M, Isobe M, Furukawa T. Genetic variants associated with susceptibility to atrial fibrillation in Japanese population. *Can. J. Cardiol.* 2017;33:443-449.
 15. Ebana Y, Ozaki K, Liu L, Hachiya H, Hirao K, Isobe M, Kubo M, Tanaka T, Furukawa T. Clinical utility and functional analysis of variants in atrial fibrillation-associated locus 4q25. *J. Cardiol.* 2017 (in press).
 16. Low SK, Takahashi A, Ebana Y, Ozaki K, Christophersen IE, Ellinor PT; AFGen Consortium., Ogishima S, Yamamoto M, Satoh M, Sasaki M, Yamaji T, Iwasaki M, Tsugane S, Tanaka K, Naito M, Wakai K, Tanaka H, Furukawa T, Kubo M, Ito K, Kamatani Y, Tanaka T. Identification of six new genetic loci associated with atrial fibrillation in the Japanese population. *Nat. Genet.* 2017 (in press).
 17. Li M, Kanda Y, Ashihara T, Sasano T, Nakai Y, Kodama M, Hayashi E, Sekino Y, Furukawa T, Kurokawa J. Overexpression of KCNJ2 in induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for the assessment of QT-prolonging drugs. *J. Pharmacol. Sci.* 2017 (in press).
- [学会発表](計33件)
1. Furukawa T. Genetic background of atrial fibrillation. The 80th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society Symposium, March 18, 2017, Kanazawa.
 2. 古川哲史. コモン不整脈の遺伝的リスク. 第243回日本循環器学会関東甲信越地方会教育講演、2017年2月4日、東京.
 3. 田村文弥、家田真樹、鈴木岳之、福田恵一、中谷晴昭、原田信広、古川哲史、黒川洵子. 女性ホルモンが心電図QT間隔に与える影響. 日本適応医学会学術集会、2016年12月16日、東京.
 4. 黒川洵子、児玉昌美、高橋健太郎、諫田泰成、古川哲史. ヒトiPS由来心筋細胞の動きベクトル解析による抗がん剤心毒性の評価法. 第26回日本循環薬理学会. 2016年12月2日、長野.
 5. 古川哲史、コモン不整脈の遺伝的リスク、第38回心筋生検研究会教育講演、2016年11月26日、東京.
 6. 古川哲史、コモン不整脈の遺伝的リスク、第64回日本心臓病学会学術集会教育講演、2016年9月23日、東京.
 7. Kurokawa J, Kanda Y, Kodama M, Sekino Y, Furukawa T. Effects of anticancer drugs on contractile behaviors of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte monolayers evaluated with an image-based analysis using motion field imaging technique. 2016 SPS/JSPS/CSPT 合同年会. 2016年09月19日、バンクーバー、カナダ.
 8. Liu L, Ebana Y, Nitta J, Takahashi Y, Miyazaki S, Tanaka T, Komura M, Isobe M, Furukawa T. Common genetic variants indicate the risk of atrial fibrillation in Japanese population. 第63回日本不整脈心電学会学術大会シンポジウム、2016年7月16日、札幌.
 9. Sasano T, Hamada S, Hasegawa Y, Nishimura T, Yoshitake T, Shiohira S, Sasaki T, Kawabata M, Goya M, Isobe M, Furukawa T, Hirao K. Individual evaluation of whole blood coagulability and factor Xa activity by novel dielectric blood coagulometry. 第63回日本不整脈心電学会、2016年07月17日、札幌.
 10. Furukawa T. Mechanisms of arrhythmias in heart failure and new advances in its management. 第63回日本不整脈心電学会、2016年07月17日、札幌.
 11. Furukawa T. Add-on type cardiac development and arrhythmias. 第63回日本不整脈心電学会、2016年07月17日、札幌.

12. 福田俊、児玉昌美、永森收志, 五十棲規嘉、藤塚美紀, 金井好克, 古川哲史, 黒川洵子. トランスジェニックマウスを利用した心筋遅延整流性カリウムチャンネル分子複合体の探索と解析, 第134回日本薬理学会関東部会, 2016年07月09日, 栃木.
13. Sasano T, Sugiyama K, Kurokawa J, Takahashi K, Okamura T, Kato N, Isobe M, Furukawa T. Oxidative Stress Induced Ventricular Arrhythmia and Impairment of Cardiac Function in Nos1ap Deleted Mice, 第9回国際NO学会、2016年05月22日、仙台.
14. Kurokawa J, Kodama M, Furukawa T, Regulation of cardiac L-type Ca²⁺ channel via a progesterone receptor, 第9回国際NO学会, 2016年05月22日、仙台.
15. Furukawa T, Liu L, Ebana Y, Nitta J, Takahashi Y, Miyazaki M, Isobe M, Tanaka T. Gene-guided therapy in AF. Heart Rhythm Society 's 37th Annual Scientific Meeting Symposium, May 6, 2016, St. Francisco, USA.
16. Hayashi Y, Nitta J, Iwasaki T, Lee K, Watanabe K, Hirao T, Kato N, Inamura Y, Suzuki M, Negi K, Satoh A, Yamato T, Matsumura Y, Asakawa K, Ebana Y, Furukawa T, Gohya M, Hirao K, Isobe M. The genotype of SNPs related whether ectopy is from pulmonary vein or others in atrial fibrillation. The 80th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 19, 2016, Sendai.
17. Hayashi Y, Nitta J, Iwasaki T, Lee K, Watanabe K, Hirao T, Kato N, Inamura Y, Suzuki M, Negi K, Satoh A, Yamato T, Matsumura Y, Asakawa K, Ebana Y, Furukawa T, Gohya M, Hirao K, Isobe M, The occurrence of ectopy from pulmonary veins in atrial fibrillation in middle-aged women, The 80th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 19, 2016, Sendai.
18. Takahashi K, Sasano T, Sugiyama K, Isobe M, Furukawa T, Contribution of pannexin-1 to cardioprotection and arrhythmogenicity induced by ischemia/reperfusion injury, The 80th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 18, 2016, Sendai.
19. Ito S, Ebana Y, Furukawa T. Neu1, ubiquitin E3 ligase, contributes to the maintenance of sarcomere structure and the regulation of autophagy. The 80th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 19, 2016, Sendai.
20. Hamada S, Hasegawa Y, Nishimura T, Furukawa T, Isobe M, Hirao K, Sasano T, Novel dielectric blood coagulometry can evaluate factor Xa and thrombin activity individually, The 80th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 19, 2016, Sendai
21. 木村麗子、児玉昌美、古谷和春、諫田泰成、倉智嘉久、関野祐子、古川哲史、黒川洵子, ヒト iPS 細胞由来心筋の活動電位形成に関連する遺伝子の定量的発現解析におけるリファレンス遺伝子の選定, 第 89 回日本薬理学会年会, 2016年03月11日, 横浜.
22. 岡田純一、吉永貴志、黒川洵子、鷲尾巧、古川哲史、澤田光平、杉浦清了、久田俊明、三次元心臓シミュレータを用いた薬剤の心毒性予測、第 89 回日本薬理学会年会, 2016年03月11日, 横浜.
23. 林英里奈、木村麗子、李敏、安東朋子、芦原貴司、関野祐子、古川哲史、諫田泰成、黒川洵子、内向き整流性カリウムチャンネルを過剰発現させたヒト iPS 由来心筋細胞を用いた薬理作用解析、第 89 回日本薬理学会年会, 2016年03月10日, 横浜.
24. 福田俊、児玉昌美、永森收志、五十棲規嘉、藤塚美紀、金井好克、古川哲史、黒川洵子、トランスジェニックマウスを利用した心筋 IKs チャンネル分子複合体の網羅的解析, 第 89 回日本薬理学会年会, 2016年03月10日, 横浜.
25. 児玉昌美、古川哲史、黒川洵子, 胎生マウスの冠血管形状に見られる性差, 第 89 回日本薬理学会年会, 2016年03月10日, 横浜.
26. Sasano T, Sugiyama K, Kurokawa J, Takahashi K, Okamura T, Kato N, Isobe M, Furukawa T, Genetic deletion of Nos1ap induced ventricular arrhythmia and impairment of cardiac function under oxidative stress condition, 5th International Conference of Cardiovascular Medicine, 2016年03月05日, Taichung, Taiwan
27. Kurokawa J, Takahashi K, Furukawa T, Functional evaluation of murine cardiomyocytes using motion imaging technique, 日本安全性薬理研究会, 2016年02月19日, 東京.
28. 児玉昌美、古川哲史、黒川洵子、マウス冠血管形成における性差の起源の探索、第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同大会 (BMB2015)

- 2015年12月02日、神戸。
29. Furukawa T. iPS cells and arrhythmia mechanism, 2015 8th APHRS, 2015年11月22日, Melbourne Australia.
 30. Sugiyama K, Sasano T, Furukawa T, Oxidative stress induced ventricular arrhythmia and impairment cardiac function in Nos1ap deleted mice, 2015 8th APHRS, 2015年11月19日, Melbourne Australia.
 31. Furukawa T, Okata S, Yuasa S, Suzuki T, Makita N, Kurokawa J, Egashira T, Yamakawa H, Seki T, Aizawa Y, Hashimoto H, Kuroda H, Tanaka A, Yae K, Murata M, Aiba T, Shimizu W, Horie M, Kamiyha K, Fukuda. Study of long QT syndrome type 3 using human iPS cell-derived cardiomyocytes, The 30th Annual Meeting of the Japanese Heart Rhythm Society, The 32nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Society of Electrocardiology, 2015年07月31日, 京都。
 32. Liu L, Ebana Y, Nitta J, Takahashi Y, Miyazaki S, Furukawa T. Combination of genetic markers predicts atrial fibrillation susceptibility in Japanese population. The 30th Annual Meeting of the Japanese Heart Rhythm Society/The 32nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Society of Electrocardiology, July 30, 2015, Kyoto.
 33. Furukawa T. The lessons learned from recent genomic studies on the pathogenesis of atrial fibrillation. The 30th Annual Meeting of the Japanese Heart Rhythm Society/The 32nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Society of Electrocardiology Symposium, July 29, 2015, Kyoto.

〔図書〕(計 7件)

1. 古川哲史. 心臓イオンチャネル A to Z. 168 ページ. ライフメディコム. 2015年7月24日.
2. 古川哲史. 目からウロコの心電図[改訂版]. 145 ページ. ライフメディコム. 2015年8月10日.
3. 古川哲史. そうだったのか! 臨床に役立つ心臓の発生・再生. 178 ページ. メディカル・サイエンス・インターナショナル. 2015年9月10日.
4. 古川哲史. 病態生理の基礎知識から学べる循環器治療薬パーフェクトガイド. 132 ページ. 総合医学社. 2016年1月21日.
5. 古川哲史. 活動電位から心電図波形を理

- 解する. In:エキスパートはここを見る. 心電図読み方の極意(三田村秀雄編集). 南山堂. 2016年8月1日.
6. 古川哲史. 臨床力をアップさせる循環器のギモン 31. 195 ページ. 南江堂. 2016年11月1日.
 7. 古川哲史. 循環器薬の選び方と使い分け. 104 ページ. 総合医学社. 2017年3月20日.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

特記事項なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

古川哲史(FURUKAWA Tetsushi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号: 80251552

(2)研究分担者

なし.

(3)連携研究者

なし.

(4)研究協力者

井原健介(IHARA Kensuke)

笹野哲郎(SASANO Tetsuro)