

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17593

研究課題名(和文)電気生理学的機能解析を用いた早期再分極症候群の病態解明と有効な治療法の探索

研究課題名(英文) Electrophysiological analysis of pathogenesis and effective therapy for early repolarization syndrome

研究代表者

高山 幸一郎 (Takayama, Koichiro)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員

研究者番号：20816988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：早期再分極症候群(ERS)は若年者心臓突然死の一因である。ERS患者11例を対象に網羅的遺伝子解析を行い、1例において新規のKCND3ヘテロ型変異(p.Gly306Ala)を同定した。培養細胞での電気生理学的機能解析により、本変異が一過性外向きカリウム電流(Ito)の機能獲得型障害を呈すること、Ito阻害薬であるキニジンとベプリジルが濃度依存的にその障害を是正すること、を明らかにした。次に、さらなる詳細な病態検討のため、ゲノム編集によって本変異のヘテロ型及びホモ型の疾患モデルiPS細胞を樹立し、心筋細胞へ分化させて実験モデルを構築することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ERSは比較的新しい疾患概念のため未解明な部分が多い。本研究成果は、原因遺伝子の同定、電気生理学的な病態解明、薬の効果発現のメカニズム解明において貢献できた。今後は、KCND3遺伝子検査によって、原因不明の特発性心室細動患者の正確な診断が可能となり、キニジンなどの適切な薬剤を使用することで若年者心臓突然死を予防することができるだろう。

研究成果の概要(英文)：Early repolarization syndrome (ERS) is one of the diseases which cause sudden cardiac death in young people. I detected a new KCND3 heterozygous mutation, p.Gly306Ala, in one of 11 ERS patients. In electrophysiological analysis using cultured cells expressing mutant Kv4.3 encoded by KCND3, I found that the mutation caused gain-of-function disorder of transient outward potassium current (Ito) produced by Kv4.3, and that quinidine and bepridil, which were Ito blockers, concentration-dependently restored the disorder. For the further experiment, I established a human iPS cell model of ERS with the KCND3 mutation by genome editing and succeeded in setting up an experimental system using cardiomyocytes differentiated from the iPS cells.

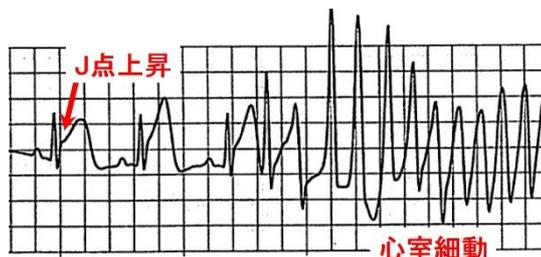
研究分野：循環器内科学

キーワード：早期再分極症候群 KCND3変異 一過性外向きカリウム電流 機能獲得型障害 キニジン ベプリジル 疾患モデルiPS細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

早期再分極症候群 (early repolarization syndrome, ERS) は、心電図上の早期再分極 (J 点上昇) と心室細動を特徴とする疾患である。J 点上昇は、以前は低体温時に認められる良性の Osborn 波として知られていたが、2008 年に特発性心室細動の患者コホートにおける研究により疾患概念が提唱された (Haissaguerre M, et al. N Engl J Med 2008;358:2016-2023.)。ERS は家族内発症を認めることがあるため遺伝性の素因が関与していると考えられており、こ



早期再分極症候群 (ERS) 患者の心電図モニター

れまでに心筋活動電位を担うイオンチャネルの遺伝子変異が ERS 患者に報告されている (Watanabe H, et al. Circ Arrhythm Electrophysiol 2011;4:874-881.)。ERS の治療法に関しては、イソプロテレノール点滴やキニジン内服が有効であるとの臨床研究報告がなされている (Haissaguerre M, et al. J Am Coll Cardiol 2009;53:612-619.) が、有効な治療法は確立されていないのが現状である。

我々の研究グループでは 1997 年から全国の不整脈診療施設より依頼された様々な遺伝性不整脈疾患の遺伝子解析を行い、同定された変異の機能解析を実施してきた。私は ERS 患者に同定された新規の遺伝子変異 (*KCNQ3* p.Gly306Ala) によって生じる変異イオンチャネルについて解析しているが、変異イオンチャネルに対してイソプロテレノールやキニジンなどの抗不整脈薬がどのような機序で効果を発揮するかは未解明なままである。

## 2. 研究の目的

ERS の病因となる遺伝子変異を探索し、その病態メカニズムを解明する。また、個々の病態に応じた最適な治療法確立を目的とする。そのために、次のことを行う。

- (1) ERS 患者に対して遺伝子解析を行い、心筋イオンチャネルの病因遺伝子変異を同定する。パッチクランプ法を用いた電気生理学的実験によって変異イオンチャネルの電流量や動態の変化を測定し、ERS のメカニズムを解明する。
- (2) 薬物負荷実験にて、変異イオンチャネルの機能異常を正常化させる薬剤を探索する。さらに薬物の負荷濃度を变化させた時の薬理効果の変化を測定し、至適薬物血中濃度を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) ERS 患者の抽出と網羅的遺伝子解析

我々の研究グループが有する遺伝性不整脈疾患の患者データベースから、ERS の患者を抽出する。ERS は疾患概念が新しく、過去の症例においてはブルガダ症候群や特発性心室細動と診断されている症例もあり、注意深く再スクリーニングを行う。それらの患者に対して、次世代シーケンサーを用いたパネル解析によって不整脈関連遺伝子の網羅的スクリーニングを行う。同定された遺伝子変異については、サンガー法によって確認する。

### (2) 電気生理学的機能解析による病態解明

変異を同定できた遺伝子がコードする蛋白質 (イオンチャネル) の機能解析を行う。培養細胞 (CHO 細胞) に変異イオンチャネルを強制発現させ、パッチクランプ法を用いた電気生理学的実験によって、変異イオンチャネルの電流量や動態 (活性化、不活性化など) の変化を測定する。

### (3) 薬物負荷実験による薬効メカニズムの解明

変異イオンチャネルに対する薬物の効果判定を行う。複数の薬剤を正確に評価するため、安定して変異イオンチャネルを発現している培養細胞株を樹立する。電気生理学的実験にて、細胞外液に種々の抗不整脈薬を負荷し、変異イオンチャネルに対する薬理効果を検討する。さらに、薬物濃度と効果の関係を解析し、理論上の至適濃度を検討する。

### (4) コンピューターシミュレーションによる心電図予測

変異イオンチャネルの機能異常と臨床像との関連を検討する。培養細胞を用いた基礎実験で得られた変異イオンチャネルのデータを *in silico* の心筋細胞モデルへ代入し、シミュレーションを用いて仮想体表面心電図を予測する。

### (5) 疾患モデル iPS 細胞の樹立

不整脈原性や薬剤副作用といった心筋細胞での ERS の病態を検討するため、疾患モデル iPS 細胞の樹立と心筋細胞への分化を試みる。健常人コントロール iPS 細胞に対してゲノム編集を行い、原因として同定された遺伝子変異をノックインする。心筋細胞へ分化させて実験系を構築する。

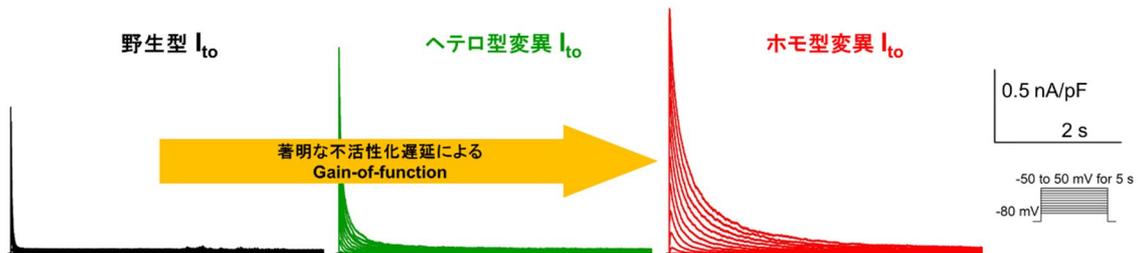
#### 4. 研究成果

##### (1) ERS 患者の抽出と網羅的遺伝子解析

遺伝性不整脈疾患患者データベースから、過去に特発性心室細動と診断されていた ERS 患者 11 例を抽出し、次世代シーケンサーでのパネル解析によって不整脈関連遺伝子を網羅的に解析した。その結果、うち 1 例において *KCNQ3* ヘテロ型変異 (p.Gly306Ala) を同定した。その他 10 例は病因と考えられる変異は同定できなかった。

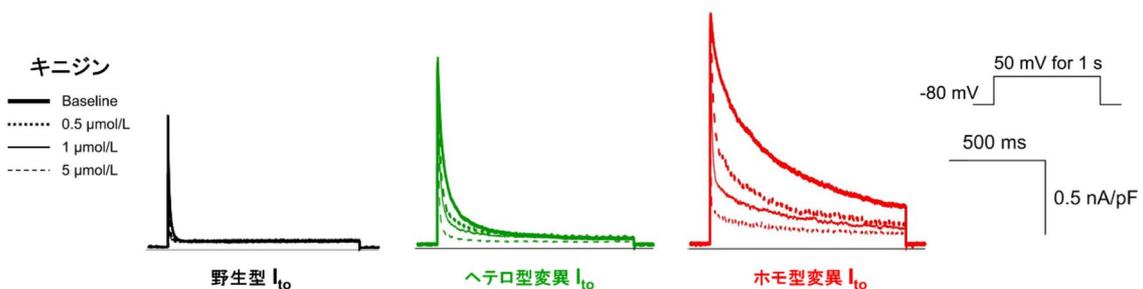
##### (2) 電気生理学的機能解析による病態解明

同定した *KCNQ3* p.Gly306Ala について電気生理学的機能解析を行った。*KCNQ3* は心筋細胞において Kv4.3 イオンチャンネルをコードし、一過性外向きカリウム電流 ( $I_{to}$ ) を形成している。Kv4.3 イオンチャンネルを野生型 (wild type, WT) のみ、WT と変異型のヘテロ、変異型のみホモ、の 3 パターンで培養細胞へ強制発現し、 $I_{to}$  電流の変化を測定した。その結果、電流量の増加、不活性化時間の著明な遅延を認め、本変異が機能獲得型障害を呈することを明らかにした。



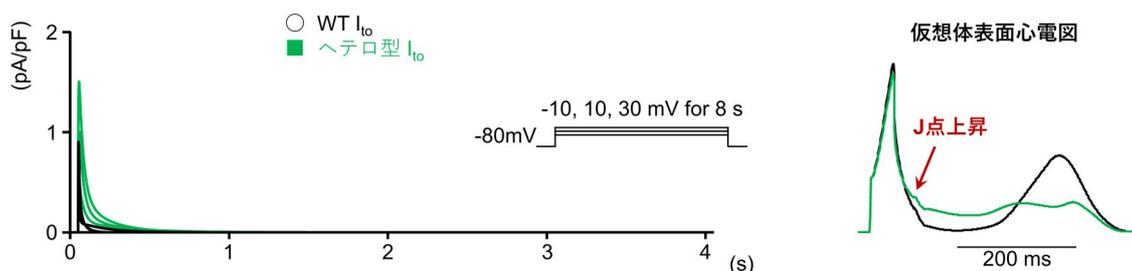
##### (3) 薬物負荷実験による薬効メカニズムの解明

当初は変異イオンチャンネルの安定発現株を構築する予定であったが、*KCNQ3* 遺伝子プラスミドのトランスフェクション効率が良好であったため、安定発現株は作成せず、随時トランスフェクションを行って培養細胞を用いた。ヒトで臨床使用可能な薬剤での検討を行うため、実験系での細胞外液中の薬剤濃度を臨床使用血中濃度に近い範囲 (0.5 ~ 5  $\mu\text{mol/L}$ ) に設定した。その結果、 $I_{to}$  電流阻害効果を有するキニジンとベプリリジルは、濃度依存的に不活性化時間遅延を是正することによって薬効を示すことを明らかにした。



##### (4) コンピューターシミュレーションによる心電図予測

培養細胞での電気生理学的機能解析で得られた変異 Kv4.3 イオンチャンネルのデータを、心筋細胞モデルへ代入した。その結果、仮想体表面心電図において J 点の上昇を認めた。これにより、 $I_{to}$  電流の機能獲得型障害が心電図の早期再分極を引き起こすと判断できた。



(5) 疾患モデル iPS 細胞の樹立

健常人コントロール iPS 細胞に対して、CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集を行い、*KCND3* 変異のヘテロ型及びホモ型の ERS 疾患モデル iPS 細胞を作成した。これらを心筋へ分化させ、心筋細胞の実験系を構築することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Koichiro Takayama, Seiko Ohno, Wei-Guang Ding, Takashi Ashihara, Daisuke Fukumoto, Yuko Wada, Takeru Makiyama, Hiroaki Kise, Minako Hoshiai, Hiroshi Matsuura, Minoru Horie	4. 巻 16
2. 論文標題 A de novo gain-of-function KCND3 mutation in early repolarization syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heart Rhythm	6. 最初と最後の頁 1698, 1706
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.hrthm.2019.05.033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Koichiro Takayama, Wei-Guang Ding, Hiroshi Matsuura, Minoru Horie, Seiko Ohno
2. 発表標題 Low Dose of Quinidine is Effective to Normalize the Slow Inactivation in Mutant Kv4.3 Channel Identified in an Early Repolarization Syndrome Patient
3. 学会等名 欧州心臓病学会（ESC）（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関