

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461054

研究課題名(和文) 不整脈疾患における遺伝的背景の病態解明

研究課題名(英文) Genetic background of inherited cardiac arrhythmias

研究代表者

牧山 武 (Makiyama, Takeru)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30528302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、不整脈疾患における遺伝的背景の解明を目指し、遺伝型・表現型の解析、変異チャンネルによる疾患発症メカニズム解析を行った。エピネフリン誘発性QT延長と洞結節機能不全がオーバーラップしたQT延長症候群3型(LQT3)の機能解析を行い、論文報告した。本報告は、LQT3治療に関する遮断薬の選択に関して新たな知見になり得ると考えられた。また、疾患特異的iPS細胞研究として、カテコラミン誘発性多形性心室頻拍の拡張期Ca上昇の再現、薬効評価を行い現在論文投稿中である。他に、L型Caチャンネル異常によるLQTのiPS細胞モデルを用いた解析、ラミンA/C遺伝子関連心筋症の遺伝型と重症度の関連を解析した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the phenotype-genotype relationship in the inherited arrhythmias and reveal the underlying mechanisms, especially, using a newly developed technology, 'patient specific induced pluripotent stem (iPS) cell model'. We identified a cardiac sodium channel mutation in a patient with sinus node dysfunction and epinephrine-induced QT prolongation. The electrophysiological properties of the mutant channels were closely associated with the overlapping clinical features of the patient. Regarding the disease-specific iPS model, we generated CPVT-iPS cell model and recapitulated arrhythmogenic features which were suppressed by a promising compound, S107. In addition, we established long QT syndrome-iPS model associated with an L-type Ca channel gene mutation and identified the impaired inactivation in the mutant channels. In LMNA-related cardiomyopathy, we investigated the impact of the type of mutation to the development of decreased left ventricular function.

研究分野：臨床心臓学

キーワード：臨床心臓学 不整脈 イオンチャンネル

1. 研究開始当初の背景

本邦では年間 5-10 万人が心臓突然死をきたしていると推測され、近年、社会では不整脈と心臓突然死への関心が急速に高まってきた。致死性不整脈の原因としては、明らかな基礎疾患がないにも関わらず心室細動を来し突然死に至る例も存在し、遺伝子異常の関与が報告されている。我々は、滋賀医科大学呼吸循環器内科との共同研究により、多施設より集積した遺伝性不整脈疾患ゲノムデータベースを構築し、解析を行ってきた。また、治療法開発のためには疾患発症分子メカニズム解明の基礎研究は必須であり、培養細胞に変異タンパクを過剰発現させた再構築系にて機能解析を行ってきた。しかし、従来の解析手法は、心筋細胞ではなく、活動電位解析ができないなど実際の患者心筋との間に 'missing link' があった。しかし、2007 年、山中らによりヒト人工多能性幹 (iPS) 胞作製が報告され (Cell 131: 861-872)、これまで困難だった患者自身の iPS 細胞を作成し、心筋細胞に分化させることにより、患者と同じ遺伝子を持つ心筋細胞の解析が可能となった。我々は、この新しい tool を用いることにより疾患発症メカニズムの解明、治療薬スクリーニングを目指し疾患特異的 iPS 細胞研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、不整脈疾患の遺伝的背景の解明を目的とし、多施設より集積した遺伝性不整脈患者ゲノムデータベースを基に、臨床・基礎研究を行った。特に、基礎研究では、新たな研究手法であるヒト iPS 細胞技術を用い疾患発症メカニズムの解明を行い、治療法開発を目指す

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた変異チャンネルの機能解析: ヒト胎児腎 (HEK) 培養細胞に変異チャンネルを過剰発現し、パッチクランプ法を用いた電気生理学的解析を行った。

(2) 疾患特異的 iPS 細胞を用いた解析: インフォームドコンセントを得た後、患者検体 (皮膚繊維芽細胞、または、末梢血リンパ球) に山中 4 因子 (OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC) を遺伝子導入しリプログラミングを行い iPS 細胞を樹立した。胚様体形成法 (Yang et al. Nature 2008) にて心筋分化を行い、6-8 週後に解析を行った。コントロールとして健常人より作成した 201B7、253G1 クローンを用いた。

4. 研究成果

(1) エピネフリン誘発性 QT 延長と洞結節機能不全がオーバーラップした QT 延長症候群 3 型 (LQT3) (SCN5A-V2016M) の機能解析

先天性 QT 延長症候群は、原因遺伝子により型分けされ、運動・エピネフリン負荷時に QT 延長、心室性不整脈を来す症例は KCNQ1 遺伝子変異による LQT1 に典型的であり、SCN5A 遺伝子によるもの (LQT3) は、夜間・安静時に発作を来しやすいとされている。今回我々は、

エピネフリン負荷 QT 延長+洞不全症候群症例において SCN5A 遺伝子の最後のアミノ酸を変化させる変異を検出し、本症例の疾患発症メカニズムとの関連を解析した。失神歴のあるエピネフリン負荷 QT 延長+洞不全症候群症例 (24 歳男性) において検出された SCN5A 遺伝子変異 (c.6046 G>A, p.V2016M) に関して、変異を導入したプラスミドを作製し、HEK 細胞に心臓 Na チャネル サブユニット、1 サブユニットと共発現させた過剰発現系においてホールセル・パッチクランプ法を用いた電気生理学的機能解析を行った。エピネフリン負荷後の変化をみるために PKA 刺激として、PKA activator: 8-CPT-cAMP、PKC 刺激として、PKC activator : 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) を用いた。パッチクランプ法を用いた Na 電流解析の結果、野生型 (WT) に比べて変異チャンネル (V2016M) はピーク Na 電流量の低下を認め (WT, 175.2 ± 17.6 pA/pF; V2016M, 97.2 ± 16.0 pA/pF; $p < 0.01$)、臨床所見で見られる徐脈に合致する所見であった。(図 1) また、チャンネルキネティクスに関しては、ベースラインでは明らかな変化を認めなかったが、PKA 刺激で、late Na 電流が増加し (WT, $0.07 \pm 0.01\%$; V2016M, $0.17 \pm 0.03\%$; $p < 0.05$; 図 2)、PKA、または、PKC 刺激においてチャンネルの不活性化の障害を認めた。(WT に比べて、PKC、PKC 刺激下で fast inactivation の脱分極側シフト、PKC 刺激下で development of slow inactivation、closed-state inactivation の低下)

図 1 心臓 Na チャネル (野生型 (WT) と V2016M 変異チャンネル) の電流記録 (A) と電流電圧曲線 (B)

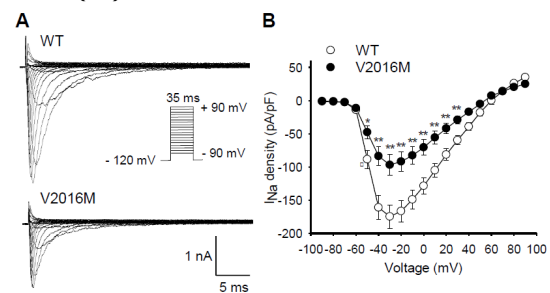


図 2 A. PKA、PKC 刺激下の遅延 Na 電流記録

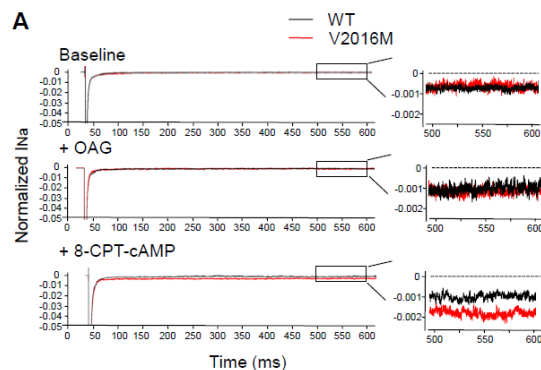
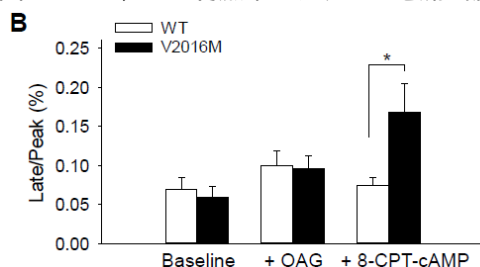


図 2 B. PKA、PKC 刺激下の遅延 Na 電流密度



これらの所見はエピネフリン負荷時の Na チャネル機能亢進を示唆する所見であった。エピネフリン負荷 QT 延長+洞不全症候群症例にて検出された SCN5A-V2016M 変異の機能解析結果は、atypical LQT3 の疾患発症機序に合致する所見であった。LQT3 に対する遮断薬の有効性に関してはエビデンスが少なく controversial であり、本研究は重要な知見を与えると考える。本研究は論文発表を行った。(Chen et al. Heart Rhythm 2016)

(2)疾患特異的ヒト iPS 細胞を用いた遺伝性不整脈疾患の解析 カテコラミン誘発性多形性心室頻拍 (CPVT)

CPVT は、運動や情動などのカテコラミン刺激によって、心室頻拍・細動による突然死を引き起こす遺伝性不整脈疾患である。原因遺伝子として約 50-60%に筋小胞体からの Ca 放出に関わるリアノジン受容体 (RyR2) 遺伝子異常が検出される。今回、CPVT の病態解明を目的とし、患者より iPS 細胞を作製し、分化心筋の解析を行った。運動時の失神既往、二方向性心室頻拍を認め、RyR2 遺伝子異常 (p. I4587V) が検出されている CPVT 患者より iPS 細胞を作成し、分化心筋の解析を行った。Ca imaging dye として Fluo-8 を用い、単一心筋細胞の Ca transient を計測した (AQUACOSMOS, 浜フォト)。計測は、15sec ずつ、rate 30, 60/分にて電氣的ペースングを行い、イソプロテレノール 100nM 負荷後、同様に電氣的ペースングを行い記録した。イソプロテレノール負荷後、拡張期細胞内 Ca 増加 (diastolic Ca wave) を認め、それに伴う triggered activity も観察され、CPVT-iPS 細胞由来分化心筋では、イソプロテレノール負荷後、diastolic Ca wave を認める細胞が有意に多かった。(CPVT 55% (n=31) v.s. コントロール 22% (n=36), pacing rate 30/min, p=0.02, CPVT 50% (n=34) v.s. コントロール 19% (n=43), pacing rate 60/min, p=0.01) また、パッチクランプ法を用いた活動電位解析では、イソプロテレノール負荷後、遅延後脱分極 (DAD) を有意に多く認めた。(図 3) また、本 iPS 細胞モデルを用いて、RyR2 安定化作用を持つ化合物 S107 を投与したところ、有意に DAD の発生を抑えた。(図 4) 上記のように本モデルは病態解明や薬効評価に役立つと期待される。

図 3 .CPVT-iPS 細胞由来分化心筋の活動電位

解析 (DAD: 遅延後脱分極)

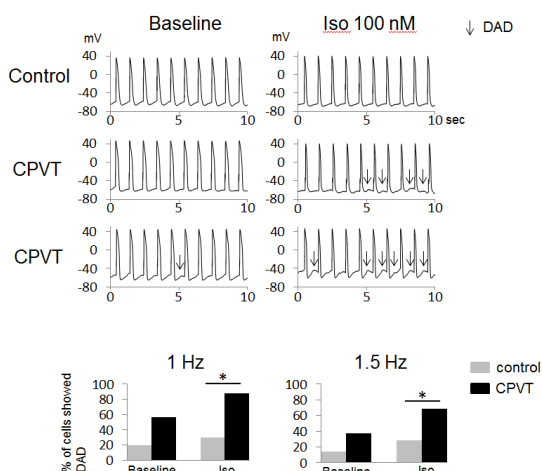
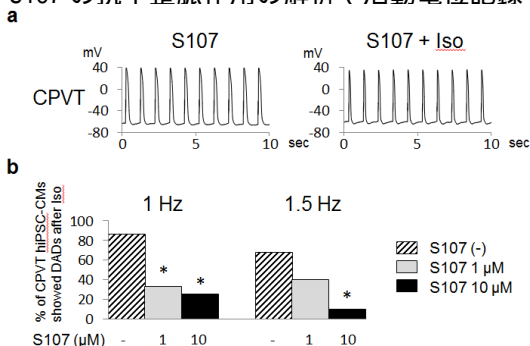


図 4 . CPVT-iPS 細胞由来分化心筋における S107 の抗不整脈作用の解析 (活動電位記録)



(3)疾患特異的ヒト iPS 細胞を用いた遺伝性不整脈疾患の解析 QT 延長症候群 8 型

心臓 L 型カルシウムチャネル サブユニットをコードする CACNA1C 遺伝子は、その変異により Timothy 症候群 (QT 延長による致死性不整脈、合指症、免疫不全を伴う) という予後不良な疾患を引き起こすことが知られている。我々は、最近、心以外の症状を伴わない新たな CACNA1C 遺伝子変異による QT 延長症候群を報告した (Europace 2014)。今回、心外症状を伴わない CACNA1C-A582D 変異を持つ QT 延長症候群患者より疾患特異的 iPS 細胞を作製し、分化心筋において電気生理学的解析を行った。胚様体形成法にて分化心筋を作成し、単一細胞において室温、0.5Hz ペースング下でパッチクランプ法を用いた活動電位記録を行ったところ、コントロールに比べ A582D にて有意に活動電位が延長していた。(APD90 (ms); A582D: 1388 ± 83, control: 1045 ± 77; P < 0.01) (図 5) 次に、L 型カルシウム電流記録を行ったところ、電流の不活性化の障害によるチャネルの機能亢進を認め、QT 延長症候群に合致する所見と考えられた。(r300(300ms 後の内向き Ca 電流密度); A582D: 0.120 ± 0.005, control: 0.035 ± 0.011 at 0 mV; P < 0.01) Ca 電流の不活性化障害の程度は既報の Timothy 症候群より軽

度であり、変異による電流変化の程度が心外症状に關与している可能性が推察された。現在本モデルを用いた薬効評価を進めている。

図5 .LQT8-iPS細胞由来分化心筋の活動電位解析

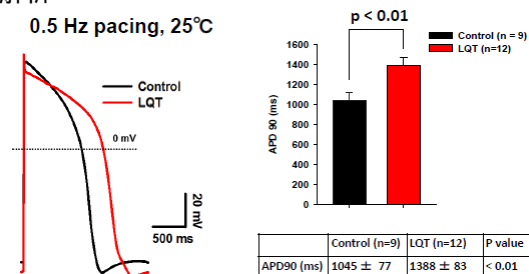
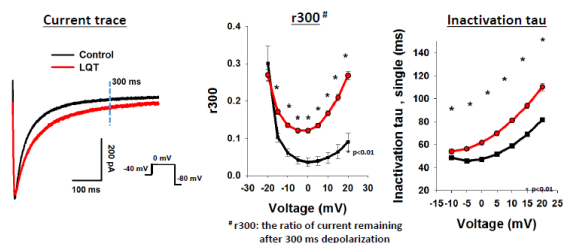


図6 .LQT8-iPS細胞由来分化心筋のL型Caチャネル電流解析 (r300:300ms後の内向きCa電流密度)

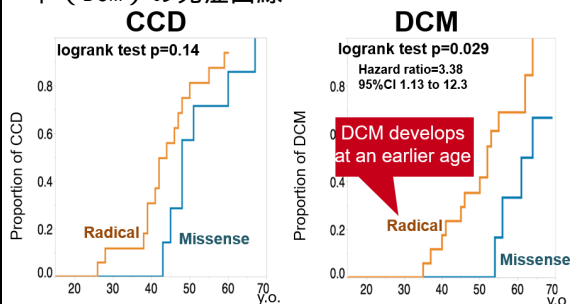


(4)ラミン A/C 遺伝子関連心筋症の病態解析

Lamin A/C 遺伝子は、核膜の裏打ち蛋白である Lamin A, C をコードし、核膜の構造保持や DNA 転写、遺伝子発現に重要な役割を果たす。本遺伝子異常はラミノパチと呼ばれる種々の疾患を引き起こし、特に心臓では、拡張型心筋症+心臓伝導障害を呈する。本疾患は、致死性不整脈や重症心不全の合併により予後不良であり、根本的治療法のない難治性疾患である。我々は、Lamin A/C 関連心筋症の病態解明のため、LaminA/C 遺伝子変異が判明している患者の表現型に関して検討を行った。Lamin A/C 遺伝子変異の判明している発端者 29 例、家系内遺伝子変異キャリアー 27 例において表現型 (年齢、性別、伝導障害、心機能低下、致死性心室性不整脈、突然死の家族歴) と変異型 (missense 変異、non-missense 変異) の検討を行った。発端者 29 例の変異型は missense 変異 38%、non-missense 変異 62% (nonsense 変異 14%、deletion 変異 42%、insertion 変異 3%、splicing error 3%) であった。missense 変異群、non-missense 変異群の比較にて、伝導障害 (洞不全症候群 (39% vs 18%)、房室ブロック (61% vs 46%)) に差は認めず、左室機能低下が non-missense 変異群で有意に多い結果であった (78% vs 36%、 $P < 0.05$)。心室頻拍・心室細動の発症は両群で差を認めなかった。また、心機能低下は、non-missense 群でより早期に発症していた (logrank test $p = 0.029$)。 (図7) 家系内遺伝子変異キャリアー 27 例を加えた、計 56 例の解析でも、心

機能低下は、non-missense 群でより早期に発症する同様の結果を認めた (logrank test $p = 0.014$)。Lamin A/C 遺伝子関連心筋症患者において、non-missense 変異は、missense 変異例より、早期にまた高率に左室機能低下を来す可能性を初めて報告した。本知見が病態の把握、患者診療への還元されることが期待される。

図7 .ラミン A/C 遺伝子関連心筋症発端者における変異型 (ミスセンス変異、非ミスセンス変異) 別の心臓伝導障害 (CCD) 心機能低下 (DCM) の発症曲線



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 15 件)

- Chen J, Makiyama T*, Wuriyanghai Y, Ohno S, Sasaki K, Hayano M, Harita T, Nishiuchi S, Yuta Yamamoto, Ueyama T, Shimizu A, Horie M, Kimura T. Cardiac sodium channel mutation associated with epinephrine-induced QT prolongation and sinus node dysfunction. Heart Rhythm. 2016 Jan;13(1):289-98. doi:10.1016/j.hrthm.2015.08.021. Epub 2015 Aug 14. PMID: 26282245 * Corresponding author
- Itoh H, Crotti L, Aiba T, Spazzolini C, Denjoy I, Fressart V, Hayashi K, Nakajima T, Ohno S, Makiyama T, Wu J, Hasegawa K, Mastantuono E, Dagradi F, Pedrazzini M, Yamagishi M, Berthet M, Murakami Y, Shimizu W, Guicheney P, Schwartz PJ, Horie M. The genetics underlying acquired long QT syndrome: impact for genetic screening. Eur Heart J. 2015 Dec 28. pii: ehv695. [Epub ahead of print] PMID: 26715165
- Itoh H, Berthet M, Fressart V, Denjoy I, Maugenre S, Klug D, Mizusawa Y, Makiyama T, Hofman N, Stallmeyer B, Zumhagen S, Shimizu W, Wilde AA, Schulze-Bahr E, Horie M, Tezenas du Montcel S, Guicheney P. Asymmetry of parental origin in long QT syndrome: preferential maternal transmission of KCNQ1 variants linked to channel dysfunction. Eur J

Hum Genet. 2015 Dec 16. doi: 10.1038/ejhg.2015.257. [Epub ahead of print] PMID: 26669661

Kato K, Takahashi N, Fujii Y, Umehara A, Nishiuchi S, Makiyama T, Ohno S, Horie M. LMNA cardiomyopathy detected in Japanese arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy cohort. *J Cardiol*. 2015 Nov 24. pii: S0914-5087(15)00355-X. doi: 10.1016/j.jcc.2015.10.013. [Epub ahead of print] PMID: 26620845

Fukuyama M, Ohno S, Makiyama T, Horie M. Novel SCN10A variants associated with Brugada syndrome. *Europace*. 2015 Apr 4. pii: euv078. [Epub ahead of print] PMID: 25842276

Wang Q, Ohno S, Ding WG, Fukuyama M, Miyamoto A, Itoh H, Makiyama T, Wu J, Bai J, Hasegawa K, Shinohara T, Takahashi N, Shimizu A, Matsuura H, Horie M. Gain-of-function KCNH2 mutations in patients with Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2014 May;25(5):522-30. doi: 10.1111/jce.12361. Epub 2014 Jan 30. PMID: 24400717 (査読有)

Fukuyama M, Wang Q, Kato K, Ohno S, Ding WG, Toyoda F, Itoh H, Kimura H, Makiyama T, Ito M, Matsuura H, Horie M. Long QT syndrome type 8: novel CACNA1C mutations causing QT prolongation and variant phenotypes. *Europace*. Dec;16(12):1828-37. doi: 10.1093/europace/euu063. Epub 2014 Apr 12. (査読有)

Kato K, Makiyama T, Wu J, Ding WG, Kimura H, Naiki N, Ohno S, Itoh H, Nakanishi T, Matsuura H, Horie M. Cardiac channelopathies associated with infantile fatal ventricular arrhythmias: from the cradle to the bench. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2014 Jan;25(1):66-73. doi: 10.1111/jce.12270. Epub 2013 Sep 24. (査読有)

Ohno S, Omura M, Kawamura M, Kimura H, Itoh H, Makiyama T, Ushinohama H, Makita N, Horie M. Exon 3 deletion of RYR2 encoding cardiac ryanodine receptor is associated with left ventricular non-compaction. *Europace*. 2014 Nov;16(11):1646-54. doi:10.1093/europace/eut382. Epub 2014 Jan 6. (査読有)

Zhou J, Ding WG, Makiyama T, Miyamoto A, Matsumoto Y, Kimura H, Tarutani Y, Zhao J, Wu J, Zang WJ, Matsuura H, Horie M. A novel HCN4 mutation, G1097W, is associated with atrioventricular block. *Circ J*.

2014;78(4):938-42. PMID: 24728418 (査読有)

Hasegawa K, Ohno S, Ashihara T, Itoh H, Ding WG, Toyoda F, Makiyama T, Aoki H, Nakamura Y, Delisle BP, Matsuura H, Horie M. A novel KCNQ1 missense mutation identified in a patient with juvenile-onset atrial fibrillation causes constitutively open IKs channels. *Heart Rhythm*. 2014 Jan;11(1):67-75. doi: 10.1016/j.hrthm.2013.09.073. Epub 2013 Oct 1. PMID: 24096004 (査読有)

Abe K, Machida T, Sumitomo N, Yamamoto H, Ohkubo K, Watanabe I, Makiyama T, Fukae S, Kohno M, Harrell DT, Ishikawa T, Tsuji Y, Nogami A, Watabe T, Oginosawa Y, Abe H, Maemura K, Motomura H, Makita N. Sodium channelopathy underlying familial sick sinus syndrome with early onset and predominantly male characteristics. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2014 Jun;7(3):511-7. doi:10.1161/CIRCEP.113.001340. Epub 2014 Apr 24. PMID: 24762805 (査読有)

Araki A, Katsuno M, Suzuki K, Banno H, Suga N, Hashizume A, Mano T, Hijikata Y, Nakatsuji H, Watanabe H, Yamamoto M, Makiyama T, Ohno S, Fukuyama M, Morimoto S, Horie M, Sobue G. Brugada syndrome in spinal and bulbar muscular atrophy. *Neurology*. 2014 May 20;82(20):1813-21. doi:10.1212/WNL.0000000000000434. Epub 2014 Apr 23. PMID: 24759840 (査読有)

Kamakura T, Makiyama T*, Sasaki K, Yoshida Y, Wuriyanghai Y, Chen J, Hattori T, Ohno S, Kita T, Horie M, Yamanaka S, Kimura T. Ultrastructural maturation of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in a long-term culture. *Circ J*. 2013;77(5):1307-14. PMID: 23400258 * Corresponding author (査読有)

Villafañe J, Atallah J, Gollob MH, Maury P, Wolpert C, Gebauer R, Watanabe H, Horie M, Anttonen O, Kannankeril P, Faulkner B, Bleiz J, Makiyama T, Shimizu W, Hamilton RM, Young ML. Long-term follow-up of a pediatric cohort with short QT syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Mar 19;61(11):1183-91. doi:10.1016/j.jacc.2012.12.025. Epub 2013 Jan 30. PMID: 23375927 (査読有)

[学会発表](計13件)

西内英、牧山武: Abnormal expressions of

cardiac ion channels-associated genes in lamin A/C-related cardiomyopathy-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, European Society of Cardiology (ESC) Congress 2015, London, United Kingdom, 8.29-9.2, 2015, (poster)

山本雄大、牧山武: Modeling of long-QT syndrome associated with a calmodulin mutation using human induced pluripotent stem cells, American Heart Association Scientific Sessions (AHA) 2015, Orland, United States, 11.7-11.11, 2015, (poster)

牧山 武: トピック, iPS を用いた再生医療: Structural and Electrophysiological Characteristic of Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes, 第 79 回日本循環器学会学術集会, 大阪, 4.24-26, 2015 (oral)

西内英、牧山武: LMNA Related Cardiomyopathy Specific Induced Pluripotent Stem Cells derived Cardiomyocytes Stressed by Adrenergic Stimulation Recapitulate the Aging Related Phenotype in an Early Phase of Differentiation, 第 79 回日本循環器学会学術集会, 大阪, 4.24-26, 2015 (oral)

張田健志、牧山武: Electrophysiological Properties of L-type Calcium Channels in Human Induced Pluripotent Stem Cells-Derived Cardiomyocytes, 第 79 回日本循環器学会学術集会, 大阪, 4.24-26, 2015 (poster)

陳嘉容、牧山武: Cardiac Sodium Channel Mutation Associated With Epinephrine-Induced QT Prolongation and Sinus Node Dysfunction, 第 30 回日本不整脈学会学術大会 / 第 32 回日本心電学会学術集会, 京都, 7.28-31, 2015, (poster)

張田健志、牧山武: The Phenotype in Cardiomyocytes Derived from Induced Pluripotent Stem Cells of Long QT Syndrome type 8 Patients without Extracardiac Phenotypes, 第 80 回日本循環器学会学術集会, 仙台, 3.18-20, 2016, (poster)

牧山武: Update in genetics of cardiomyopathy-Laminopathy-, The 7th Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHRS) Scientific Session, Delhi, India, 10.29-11.1, 2014. (invited speaker)

山本雄大、牧山武: Electrophysiological Characteristics and Transcriptional Profiles in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes During a Long-Term Culture Chicago, USA, 11.15-19, 2014 (poster)

西内英、牧山武: The Relationship Between the Type of Mutations in Lamin A/C Gene and Cardiac Phenotype-Genetic Risk Factor for Dilated Cardiomyopathy-, 第 78 回日本循環器学会学術集会, 東京, 3.21-23, 2014 (Oral, Featured research session)

牧山武: Modeling Inherited Arrhythmias Using Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes and Application in Personalized Medicine, 第 31 回日本心電学会学術集会、第 29 回日本不整脈学会学術大会合同学術集会, 東京, 7.22-25, 2014 (シンポジウム)

佐々木健一、牧山武: Modeling Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia using Human Induced Pluripotent Stem Cells: A Promising Tool for Drug Discovery, American Heart Association Scientific Sessions 2013, Dalas, USA,

牧山武: iPS 細胞由来の不整脈疾患モデル心筋細胞. 学術委員会指定トピックス「iPS 細胞の臨床応用—現状と展望—」第 30 回日本心電学会学術集会(青森), 10.11-13, 2013

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧山 武 (MAKIYAMA, Takeru)

京都大学・大学院医学研究科循環器内科学・助教

研究者番号: 30528302