

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17595

研究課題名（和文）致死性家族性不整脈疾患における最新ゲノム編集技術を用いた疾患特異的iPS細胞研究

研究課題名（英文）iPS cell-based modeling of inherited arrhythmia disorders using the latest genome editing technology

研究代表者

烏日揚海 伊敏 (Wuriyanghai, Yimin)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：10824956

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、致死性家族性不整脈疾患における最新ゲノム編集技術を用いた疾患特異的iPS細胞研究を目的とし、心臓L型Ca²⁺チャネル遺伝子のヘテロミスセンス変異（CACNA1C p.E1115K）を有するQT延長症候群とBrugada症候群の合併例の解析を行った。コントロールとして、患者由来iPS細胞においてCRISPR-Cas9システムを用いて遺伝子変異をcorrectionしたiPS細胞株を用いた。患者由来iPS細胞由来心筋細胞では、変異Ca²⁺チャネルでは、イオン選択性が障害され、活動電位持続時間の延長、プラトー相の低下を認め、患者病態を再現するiPS細胞モデルの作製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性疾患患者由来iPS細胞モデルの解析に際して、コントロールとして健常人由来のiPS細胞のみの使用では、対象遺伝子変異以外の遺伝的背景が異なりその影響が除外できないという問題がある。本研究では、ゲノム編集技術を用いて変異をcorrectionさせたiPS細胞モデルをコントロールとすることにより対象変異が引き起こす変化を精密性の高い系を用いて解析した。また、ゲノム編集技術は、患者よりiPS細胞を作製できないケースやcompound変異等の解析にも有用であらう。ゲノム編集技術を用いたiPS細胞モデルは、病態解明、創薬研究への発展、患者診療への貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to analyze disease-specific iPS cell model using the latest genome editing technology in inherited arrhythmia disorders. We analyzed a case of QT prolongation syndrome and Brugada syndrome with a hetero-missense mutation (CACNA1C p.E1115K) in the cardiac L-type Ca²⁺ channel gene. As a control, we used an iPS cell line in which the mutation was corrected using the CRISPR-Cas9 system in patient-derived iPS cells. In the patient-derived iPS cell cardiomyocytes, mutant Ca²⁺ channels showed impaired ion selectivity, prolonged action potential duration, and decreased plateau phase. Thus, we successfully established an iPS cell model that reproduced the patient's clinical phenotypes.

研究分野：循環器内科学

キーワード：不整脈 iPS細胞 心臓突然死 遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

致死性遺伝性不整脈疾患はそれまで健康であった若年者にも突然死を来し得るため、社会的影響が非常に大きい。また、突然死予防の植込み型除細動器治療は精神的・肉体的負担も大きく、適応の検討、創薬を含めた新たな治療法の開発が望まれている。近年の次世代シーケンサーによる遺伝子解析技術の進歩に伴い多くの遺伝子変異が検出されるようになったが、遺伝子変異の病原性、不整脈の発症機序に関しては未だ不明な点が多く、治療法開発のためには疾患発症分子メカニズムの解明は必須であると考えられる。従来の研究は、非心筋培養細胞に変異タンパクを過剰発現させた再構築系や動物モデルを用いたものであり、ヒト心臓組織との間に乖離があったが、2007年、京都大学 iPS 細胞研究所、山中らが開発したヒト iPS 細胞を用いることにより、患者と同じ遺伝的背景を持った「ヒト心筋」における解析が可能となった。また、本研究では、近年、革新的進歩を遂げている人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集技術を駆使することにより、より詳細な正確性の高い疾患特異的 iPS 細胞モデルを用いた研究を行うことを計画した。

2. 研究の目的

本研究では、致死性遺伝性不整脈疾患に関する病態解明、治療法開発を目的とし、最新のゲノム編集技術を用いた iPS 細胞モデルを用いた研究を行う。対象となる不整脈疾患に関しては、研究を進行中である、QT 延長症候群、compound 変異症例、LMNA 関連心筋症を対象とした。

3. 研究の方法

iPS 細胞樹立に関しては、患者より同意を得て、末梢血単核球を採取、エピソーマルベクターを用いてリプログラミング因子を導入し、iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞に関しては、免疫染色による未分化マーカーの発現、核型解析を行った。iPS 細胞におけるゲノム編集に関しては、Cas9 蛋白、guide RNA、鋳型一本鎖 DNA (Integrated DNA Technologies) をエレクトロポレーション (NEPA21, ネッパジーン) により、遺伝子導入を行い、single cell cloning 後、ダイレクトシーケンシングにて目的クローンを選択した。電気生理学的機能解析に関しては、Multiclamp 700B amplifier、Digidata 1440 digitizer hardware (Molecular Devices) を用いてイオンチャネル電流記録、活動電位記録を行った。また、活動電位記録時に、電気的に IK1 電流を加えた dynamic clamp 法を行った。

4. 研究成果

ゲノム編集技術を用いた遺伝性不整脈疾患ヒト iPS 細胞モデルの解析に関して、主に取り組んだ心臓 L 型 Ca²⁺チャネル遺伝子変異 (CACNA1C p.E1115K) に関する解析結果を報告する。心臓 L 型 Ca²⁺チャネルは、CACNA1C 遺伝子によりコードされ、心筋細胞の興奮、収縮に重要な役割を果たしている。1115 番目のグルタミン酸(E)は、Ca²⁺選択性に重要であることが知られており、当該アミノ酸がリジンに変異するヘテロミスセンス変異 (CACNA1C p.E1115K) を有する QT 延長症候群と Brugada 症候群を合併した症例より iPS 細胞を樹立し、分化心筋細胞を用いた発症機序解明を行った。樹立した iPS 細胞における免疫染色にて未分化マーカー (SSEA4, TRA-1-60, OCT3/4) を発現しており、核型検査にて異常を認めなかった。コントロールとして、健康人由来 iPS 細胞株 (201B7) と患者由来 iPS 細胞において CRISPR-Cas9 システムを用いて遺伝子変異を correction した iPS 細胞株 (isogenic control) を用いた。

iPS 細胞由来分化心筋細胞におけるパッチクランプ記録を用いた電流記録では、E1115K において、コントロールと比較し、内向き Ca²⁺電流密度は約半分に減少し、さらに大きな外向き電流を認めた (図 2 左)。外向き電流は、細胞内の Cs⁺電流とかがえられ、Ca²⁺の選択性が障害され、一価のイオンの透過性が上昇していることが示唆された。電流電圧曲線 (図 2 右) では、E1115K の逆転電位が過分極側にシフトしており、これからも変異 L 型 Ca²⁺チャネルにおけるイオン選択性が障害されていることが示唆された。

次に、変異 E1115K チャネルの Na⁺透過性を調べるため、細胞外液に 140 mM Na⁺が存在し、Ca²⁺ free の状態で L 型 Ca²⁺チャネル電流と同じ脱分極刺激パルス刺激下で電流を測定した (図 3)。コントロール (正常な L 型 Ca²⁺チャネル) では、細胞内向き電流 (図では下向き) を認めなかったが、E1115K-L 型 Ca²⁺チャネルでは、持続性の内向き電流 (変異 L 型 Ca²⁺チャネルを通る Na⁺電流) を認め、変異チャネルは Na⁺透過性を有していることが示された。

活動電位記録 (図 4) では、E1115K において活動電位の延長 (QT 延長症候群に合致)、プラトー相の電位低下 (Brugada 症候群の機序)、催不整脈性を示す所見 (早期後脱分極、活動電位持続時間の交互性変動) が認められ、本 iPS 細胞モデルは、患者における表現型を再現していた。

現在、本モデルにおける内因性遅延 Na⁺電流の役割に注目し、治療候補薬の検討をすすめており、病態解明、創薬のための有用な疾患プラットフォームになり得ると考える。

図1 心臓L型Ca²⁺チャネルの模式図

1115番目のグルタミン酸(E)は、Ca²⁺選択性に重要であることが知られており、当該アミノ酸がリジンに変異するヘテロミスセンス変異(CACNA1C p.E1115K)のiPS細胞モデルを樹立した。

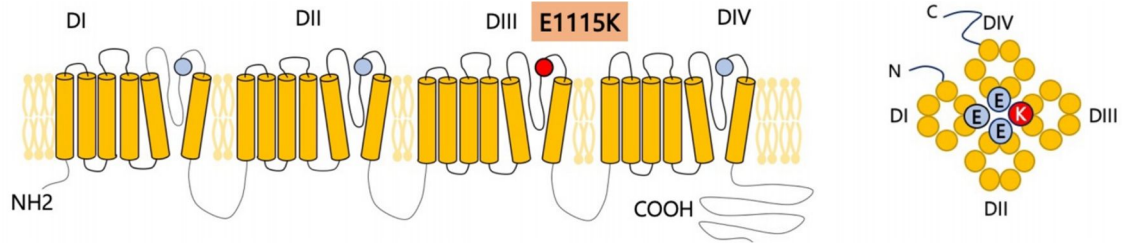
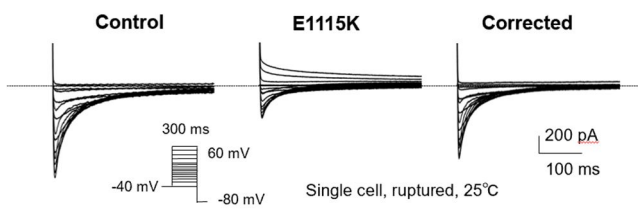


図2 L型Ca²⁺チャネル電流記録 (pipette内は、Na⁺をCs⁺に置換)

Representative traces of I_{CaL} recording



Current-voltage curve

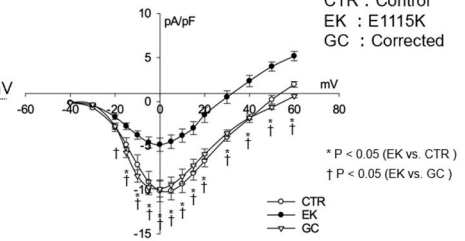
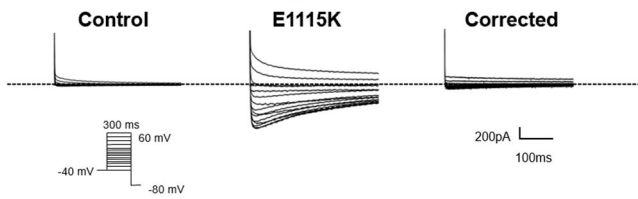


図3 L型Ca²⁺チャネルを通るNa⁺電流記録 (細胞外液 140mM Na⁺, Ca²⁺ free)

Representative traces of I_{Na-LTCC} recording



Current-voltage curve

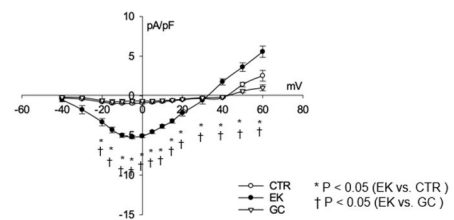
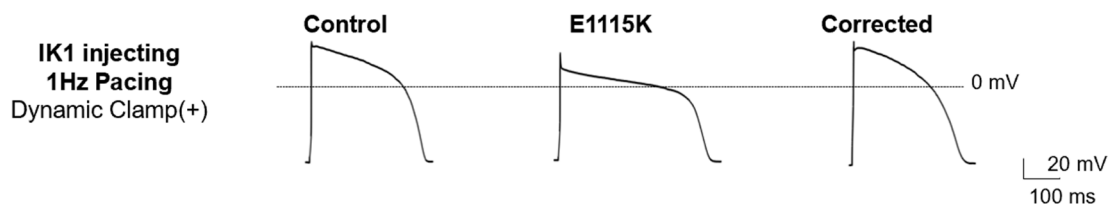


図4 活動電位記録 (電氣的に IK1 電流を加える dynamic clamp 法を用いて計測)

E1115K 心筋細胞にて活動電位持続時間の延長を認めた。

Representative figure of action potential



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshinaga Daisuke, Baba Shiro, Makiyama Takeru, Shibata Hirofumi, Hirata Takuya, Akagi Kentaro, Matsuda Koichi, Kohjitani Hirohiko, Wuriyanghai Yimin, Umeda Katsutsugu, Yamamoto Yuta, Conklin Bruce R., Horie Minoru, Takita Junko, Heike Toshio	4. 巻 13
2. 論文標題 Phenotype-Based High-Throughput Classification of Long QT Syndrome Subtypes Using Human Induced Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 394-404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2019.06.007	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 該当する

1. 著者名 堀江 稔, Wuriyanghai Yimin, 牧山 武	4. 巻 23
2. 論文標題 Expertise ヒトiPS細胞由来心筋細胞の電気生理学 (特集 心臓電気生理を理解して不整脈診療に活かす) iPS cell-derived cardiomyocytes as a platform for research on inherited arrhythmias	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heart view	6. 最初と最後の頁 578-585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Hirose Sayako, Makiyama Takeru, Melgari Dario, Yamamoto Yuta, Wuriyanghai Yimin, Yokoi Fumika, Nishiuchi Suguru, Harita Takeshi, Hayano Mamoru, Kohjitani Hirohiko, Gao Jingshan, Kashiwa Asami, Nishikawa Misato, Wu Jie, Yoshimoto Jun, Chonabayashi Kazuhisa, Ohno Seiko, Yoshida Yoshinori, Horie Minoru, Kimura Takeshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Propranolol Attenuates Late Sodium Current in a Long QT Syndrome Type 3-Human Induced Pluripotent Stem Cell Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 761
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.00761	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 0件/うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Asami Kashiwa, Takeru Makiyama, Hirohiko Kohjitani, Yimin Wuriyanghai, Yuta Yamamoto, Gao Jungshan, Hai Huang, Taisuke Ishikawa, Seiko Ohno, Futoshi Toyoda, , Seiichi Sato, Minoru Horie, Naomasa Makita, Takeshi Kimura.
2. 発表標題 Modeling Overlap Syndrome Of Long QT And Brugada Syndrome Associated With CACNA1C-E1115K Which Alters Ion Selectivity With Induced Pluripotent Stem Cells
3. 学会等名 40th Heart Rhythm Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	Hirohiko Kohjitani, Shigeya Kouda, Yukiko Himeno, Takeru Makiyama, Asami Kashiwa, Yimin Wuriyanghai, Yuta Yamamoto, Minoru Horie, Takeshi Kimura, Akinori Noma, Akira Amano.
2. 発表標題	Automatic Computational Action Potential Analyzing System Enables Accurate Drug Response Interpretation and Prediction in Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes
3. 学会等名	40th Heart Rhythm Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	J. Gao, T. Makiyama, S. Ohno, Y. Yamamoto, Y. Wuriyanghai, H. Kohjitani, A. Kashiwa, H. Huang, K. Katou, M. Horie, T. Kimura.
2. 発表標題	Structural Insights into Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia-associated RyR2 Mutant Channels using a Three-dimensional In Silico Model.
3. 学会等名	European Society of Cardiology Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Yuta Yamamoto, Takeru Makiyama, Yimin Wuriyanghai, Hirohiko Kohjitani, Sayako Hirose, Jingshan Gao, Asami Kashiwa, Huang Hai, Takanori Aizawa, Tomohiko Imamura, Taisuke Ishikawa, Seiko Ohno, Kazuhisa Chonabayashi, Hideki Motomura, Yoshinori Yoshida, Minoru Horie, Naomasa Makita, Takeshi Kimura
2. 発表標題	KCNQ1 Channel Dysfunction in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes carrying a CALM2-N98S mutation associated with long QT syndrome
3. 学会等名	American Heart Association Scientific Sessions 2019 (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Yimin Wuriyanghai, Takeru Makiyama, Yuta Yamamoto, Hirohiko Kohjitani, Sayako Hirose, Jingshan Gao, Asami Kashiwa, Hai Huang, Takanori Aizawa, Tomohiko Imamura, Seiko Ohno, Minoru Horie, Takeshi Kimura
2. 発表標題	Morphological and electrophysiological characterization of homozygous lamin A/C knockout human induced-pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. American Heart Association Scientific Sessions 2019
3. 学会等名	American Heart Association Scientific Sessions 2019 (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Yuta Yamamoto, Takeru Makiyama, Yimin Wuriyanghai, Hirohiko Kohjitani, Sayako Hirose, Jingshan Gao, Asami Kashiwa, Huang Hai, Takanori Aizawa, Tomohiko Imamura, Taisuke Ishikawa, Seiko Ohno, Kazuhisa Chonabayashi, Hideki Motomura, Yoshinori Yoshida, Minoru Horie, Naomasa Makita, Takeshi Kimura
2. 発表標題	Response of KCNQ1 to Adrenergic Stimulation was Impaired in Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes Carrying a CALM2-N98S Mutation Associated with Long QT Syndrome.
3. 学会等名	12th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session (APHR2019) (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Hirohiko Kohjitani, Shigeya Kouda, Yukiko Himeno, Takeru Makiyama, Asami Kashiwa, Yimin Wuriyanghai, Yuta Yamamoto, Minoru Horie, Takeshi Kimura, Akinori Noma, Akira Amano
2. 発表標題	Algorithmic Auto-Recreation System of hiPSC-CMs Simulation and Prediction of Drug Testing.
3. 学会等名	12th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session (APHR2019) (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Takanori Aizawa, Takeru Makiyama, Hai Huang, Tomohiko Imamura, JingShan Gao, Yimin Wuriyanghai, Takeru Makiyama, Yuta Yamamoto, Hirohiko Kohjitani, Sayako Hirose, Jingshan Gao, Asami Kashiwa, Hai Huang, Wuriyanghai Yimin, Hirohiko Kohjitani, Yuta Yamamoto, Seiko Ohno, Minoru Horie
2. 発表標題	Patients characteristics of idiopathic ventricular fibrillation carrying SCN5A mutations without Brugada or long QT syndrome.
3. 学会等名	12th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session (APHR2019) (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Hirohiko Kohjitani, Shigeya Kouda, Yukiko Himeno, Takeru Makiyama, Hai Huang, Jingshan Gao, Asami Kashiwa, Yimin Wuriyanghai, Daisuke Yoshinaga, Takeshi Kimura, Akira Amano.
2. 発表標題	Algorithmic Auto-Recreation System of hiPSC-CMs Simulation and Prediction of Drug Testing
3. 学会等名	第83回日本循環器学会学術集会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Asami Kashiwa, Takeru Makiyama, Seiko Ohno, Hisaaki Aoki, Hirohiko Kohjitani Yimin Wuriyanghai, Yuta Yamamoto, Jingshan Gao, Huang Hai, Minoru Horie, Takeshi Kimura.
2. 発表標題	Overlapping Sick Sinus Syndrome Associated with SCN5A Mutations in Patients with Brugada Syndrome
3. 学会等名	第83回日本循環器学会学術集会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Jingshan Gao, Takeru Makiyama, Seiko Ohno, Yuta Yamamoto, Yimin Wuriyanghai, Hirohiko Kohjitani, Asami Kashiwa, Minoru Horie, Takeshi Kimura.
2. 発表標題	Three-Dimensional Structural Analysis of Mutant Ryanodine Receptor Type 2 Channels Associated with Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia.
3. 学会等名	第83回日本循環器学会学術集会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Asami Kashiwa, Takeru Makiyama, Hirohiko Kohjitani, Yimin Wuriyanghai, Yuta Yamamoto, Jingshan Gao, Hai Huang, Taisuke Ishikawa, Seiko Ohno, Futoshi Toyoda, Seiichi Sato, Minoru Horie, Naomasa Makita, Takeshi Kimura
2. 発表標題	Modeling Overlapping Phenotypes of Long-QT and Brugada Syndrome with CACNA1C-E1115K that Alters Ion Selectivity of the Cardiac L-Type Calcium Channel Using Induced Pluripotent Stem Cells.
3. 学会等名	第66回日本不整脈心電学会学術大会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Hirohiko Kohjitani, Shigeya Kouda, Yukiko Himeno, Takeru Makiyama, Hai Huang, Jingshan Gao, Asami Kashiwa, Yimin Wuriyanghai, Daisuke Yoshinaga, Takeshi Kimura, Akira Amano.
2. 発表標題	Algorithmic Auto-Recreation System of hiPSC-CMs Simulation and Prediction of Drug Testing.
3. 学会等名	第66回日本不整脈心電学会学術大会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Yuta Yamamoto, Takeru Makiyama(代表), Yimin Wuriyanghai, Hirohiko Kohjitani, Sayako Hirose, Jingshan Gao, Asami Kashiwa, Huang Hai, Taisuke Ishikawa, Seiko Ohno, Kazuhisa Chonabayashi, Kenji Suda, Yoshinori Yoshida, Minoru Horie, Naomasa Makita, Takeshi Kimura,
2. 発表標題	Single Cell Electrophysiological Analysis of iPS Cell-derived Cardiomyocytes Generated from Long-QT Syndrome Patients Carrying a CALM2 Mutation Using a Membrane Potential Imaging System.
3. 学会等名	第66回日本不整脈心電学会学術大会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Jingshan Gao, Takeru Makiyama, Seiko Ohno, Yuta Yamamoto, Yimin Wuriyanghai, Hirohiko Kohjitani, Asami Kashiwa, Hai Huang, Kouichi Katou, Minoru Horie, Takeshi Kimura.
2. 発表標題	Structural Insights into Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia-associated RyR2 Mutant Channels using a Three-dimensional in Silico Model.
3. 学会等名	第66回日本不整脈心電学会学術大会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Daisuke Yoshinaga, Shiro Baba, Takeru Makiyama, Hirofumi Shibata, Takuya Hirata, Kentaro Akagi, Koichi Matsuda, Hirohiko Kohjitani, Yimin Wuriyanghai, Katsutsugu Umeda, Yuta Yamamoto, Bruce R. Conklin, Minoru Horie, Junko Takita, Toshio Heike.
2. 発表標題	Phenotype-based High-throughput Classification of Long-QT Syndrome Subtypes Using Human Induced Pluripotent Stem Cells.
3. 学会等名	第66回日本不整脈心電学会学術大会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Wuriyanghai Y, Makiyama T, Sasaki K, Kamakura T, Yamamoto Y, Hayano M, Harita T, Nishiuchi S, Chen J, Kohjitani H, Hirose S, Yokoi F, Gao J, Chonabayashi K, Watanabe K, Ohno S, Yoshida Y, Kimura T, Horie M
2. 発表標題	Complex aberrant splicing in the induce pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from a patient with long-QT syndrome carrying KCNQ1-A344Aspl mutation.
3. 学会等名	第66回日本不整脈心電学会学術大会
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
研究協力者	柏 麻美 (KASHIWA ASAMI)	京都大学・大学院医学研究科循環器内科学・大学院生 (14301)	
連携研究者	牧山 武 (MAKIYAMA TAKERU) (30528302)	京都大学・大学院医学研究科地域医療システム学・特定講師 (14301)	

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
---------	---------