

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08170

研究課題名(和文) 乳児期発症先天性QT延長症候群における心Naチャンネル複合体の役割に関する研究

研究課題名(英文) Study on the role of cardiac Na channel complexes in infantile onset congenital long QT syndrome.

研究代表者

竹内 大二 (Takeuchi, Daiji)

東京女子医科大学・医学部・准講師

研究者番号：40328456

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)：早期発症QT延長症候群3に關与するNav1.5変異とチャンネル複合体構成タンパク質(1シントロフィン、カベオリン3)の相互作用を檢討するため、野生型及び17種の変異Nav1.5安定発現細胞を作成した。オートパッチクランプ法によりNa電流を測定したところ、12変異で持続電流の増大がみられた。野生型及び5変異(12変異は、検討中)で1シントロフィン、カベオリン3との相互作用を検出した。R1623Q変異をもつLQT3患者iPS細胞から心筋細胞を分化し、外部電位持続時間を測定したところ、患者細胞は、健常者細胞に比べてQT延長を示し、メキシレチンによるNaチャンネル阻害効果がより大きかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、1) 早期発症LQTS関連Nav1.5変異の電気生理学データを、安定発現細胞とオートパッチクランプシステムにより多数得たこと、2) チャンネル作用タンパク質との相互作用の初期結果を得たこと、3) LQT3患者iPS細胞を分化した心筋細胞をマルチ電極アレイシステムにより機能解析し、QT延長や薬理的反応を測定できたことである。相互作用タンパク質によるチャンネル制御は新しい視点であり、将来的に新規治療薬開発の可能性が有る。小児循環器専門医が臨床症状と電気生理データを照合するシステムを構築できれば、本研究は、基礎研究から臨床現場への橋渡し研究としても有用と考える。

研究成果の概要(英文)：To investigate the interaction of Nav1.5 mutations, involved in early onset long QT syndrome 3, with channel complex proteins (1 syntrophin and caveolin 3), we generated wild-type and 17 mutant Nav1.5 stable cell lines. Using an automated patch-clamp system, persistent Na current was measured in 12 Nav1.5 mutant cell lines. Protein interaction between Nav1.5 (wild and 5 mutants) and 1 syntrophin or caveolin 3 was confirmed respectively. Field potential duration was significantly prolonged in Nav1.5 R1623Q mutation-harboring iPS Cell-cardiomyocytes (iPSC-CMs). Mexiletine, a Na channel blocker, preferentially suppressed QT prolongation in R1623Q iPSC-CMs.

研究分野：小児医科学

キーワード：SCN5A 早期発症 long QT syndrome 疾患iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

心臓の電氣的な働きは、イオンチャネルを介した Na, Ca, K などのイオンの移動に依存する。イオンチャネルは巨大分子複合体として機能を発揮する。心筋活動の主要な Na チャネルである膜電位依存性 Na チャネル(Nav1.5)をコードする SCN5A 遺伝子の変異による疾患には、QT 延長症候群 3 (LQT3), ブルガダ症候群、心伝導障害、洞不全症候群、心房細動、拡張型心筋症などがあり、重篤な小児遺伝性心疾患の原因となる。5,000 人に 1 人発生し、約 2 万人の小児や成人患者がいる。胎児・新生児期、乳児期早期に重症な不整脈を発症する先天性 QT 延長症候群の一群 (早期発症 LQTS) がある。早期発症 LQT3 変異は、Nav1.5 の膜貫通部位と C 末部に多く (図 1 ①~⑫ (1-3)), 最も多くの症例が集まる変異は R1623Q (図 1 ⑨) である。Na チャネル複合体構成タンパク質である $\alpha 1$ シントロフィン、カベオリン 3、 β サブユニット 4 の変異には LQT12, LQT9, LQT10 を発症するものがあるが、これらの多くは Nav1.5 の膜貫通部位や C 末側に結合部位があり、早期発症 LQTS 変異の分布と重なる (図 1)。Nav1.5 の β サブユニット ($\beta 1, 2, 3, 4$) は、成人と胎児・新生児期では発現の割合が変わる。 $\beta 1$ は成人型で、胎児・新生児には $\beta 3$ の発現割合が高い。Nav1.5 E1784K 変異は、Brugada 症候群 (loss-of-function) と LQT3 (Gain-of-function) の混在する表現型を示すが、 $\beta 3$ と共存すると Na 電流が増えて Brugada 症状が抑えられ LQT3 の特徴が現れる (Okata S, et al, 2016 (4))。発達段階における 4 種 β の発現率の変動が、Na チャネルの機能を制御し、LQTS の早期発症に関与しているのかもしれない。

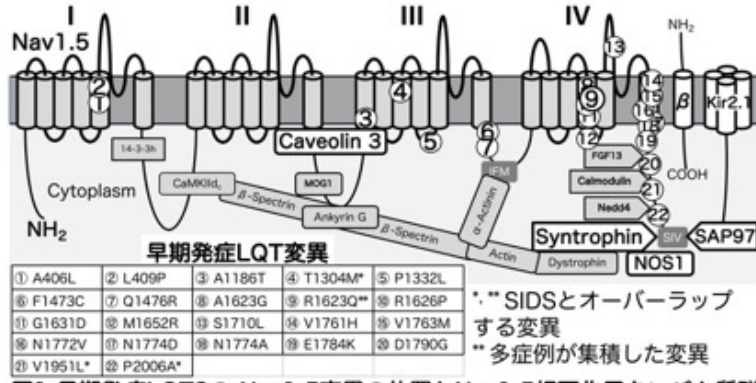


図1 早期発症LQT3の Nav1.5変異の位置とNav1.5相互作用タンパク質群
膜貫通部とC末端に変異が多い。(堀米・吉永 循環器専門医第26巻 2018, Abriel, H et al, Circ Res, 2015, Herren, AW et al, Am J Physiol Circ Physiol, 2013より引用, 改変)

2. 研究の目的

本研究では、Nav1.5 変異を伴う早期発症 LQT3 が、チャネル複合体構成タンパク質との相互作用の変化により発症するのではないかという仮説を検証するため、Nav1.5 変異タンパク質とチャネル複合体構成タンパク質の関連を生化学・電気生理学的に研究する。

3. 研究の方法

(1) Nav1.5 の電気生理学的解析

ヒト SCN5A 遺伝子に QuickChange II XL-site-directed mutagenesis kit(Agilent Technologies, USA)を用いて変異を導入した。これをハイグロマイシン耐性タイプの哺乳類発現ベクターに挿入し、塩基配列をシークエンスにより確認した。HEK293 細胞に SV40 Large T 抗原を発現させた 293T 細胞に、このコンストラクトをトランスフェクションにより導入した。ハイグロマイシンを用いて耐性を持つコロニーを選別し、Nav1.5 安定発現細胞株を作成した。目的の Nav1.5 の発現は、免疫蛍光染色やウェスタンブロットにより確認した。オートパッチクランプ法 (Syncropatch 384, ナニオンテクノロジーズジャパン) により、野生型と変異 Nav1.5 電流を室温で測定した。

(2) チャネル複合体構成タンパク質と Nav1.5 の相互作用の検討

ヒト $\alpha 1$ シントロフィン (SNTA1)、カベオリン 3 (CAV3)、Kir2.1 (KCNJ2)、Na チャネル β サブユニット 1~4 をヒト心 RNA (Biochain) から PCR クローニングし、塩基配列を確認し、ピューロマイシン耐性哺乳類発現ベクターに挿入した。SNTA1, CAV3, KCNJ2 は、GFP 融合タンパク質発現ベクターにも挿入し、lipofectamine 2000 を用いて 293T 細胞に導入し、蛍光顕微鏡により発現を検討した。また、リアルタイム PCR を用いて、ヒト心や HEK293 細胞等でのこれらの遺伝子の発現を検討した。ヒト心試料の定量解析の対象として、Biochain より購入した成人右室、左室、右房、左房、胎児心 total RNA を用いた。SNTA1, CAV3, KCNJ2, β サブユニット発現コンストラクトを Nav1.5 野生型及び一部の Nav1.5 変異型の安定発現細胞株に導入し、タンパク質相互作用を免疫沈降法により検出し、共発現細胞株の構築を試みた。

(3) Nav1.5 R1623Q 変異 iPS 細胞由来心筋細胞の機能解析及び生化学的分析

Nav1.5 R1623Q 変異を持つ患者並びに健常者の不死化 B 細胞に山中因子を導入し iPS 細胞を作

製した。SCN5A 変異及び LQT 関連遺伝子群のゲノム塩基配列を確認し、多分化能マーカー (TRA-1-60、SSEA4、OCT4) の発現を検討した。核型解析及びテラトーマ形成により 3 胚葉組織分化能の確認を行った。

Lian, X らの方法 (Nat Protoc 2013(5)) に従い、iPS 細胞を GSK3 阻害剤 (CHIR99021) により Wnt シグナルを活性化し中胚葉細胞へ誘導し、続いて Wnt シグナル阻害剤により心筋細胞へ分化した。Day8~10 で自発的に拍動する心筋前駆細胞を得、乳酸添加 (グルコース及びグルタミン無添加) で培養して心筋細胞の純化を行った。抗アクチニン染色により横紋筋構造を確めた。

分化心筋細胞を用いて、マルチ電極アレーシステム (MED64) により、心電図の QT 間隔に該当する細胞外電位や拍動頻度を計測し、チャンネルの変異による QT 間隔延長や EAD 発生のし易さなどの評価を行った。Na 遮断薬 (メキシレチン) を添加して薬理的検討を行った。

4. 研究成果

(1) Nav1.5 の電気生理学的解析

オートパッチクランプ法により、保持電位-100mV、10mV 刻みで+40 mV まで膜電位を固定し、全細胞 Na 電流を測定した。Nav1.5 野生型や各変異型の Na イオンの内向き電流の典型的な各波形を図 2 に示した。野生型 (WT) の波形と比較して、N406K, L409F, R1623Q, R1626P, G1631D, S1701L 変異では、不活性化の遅延が見られた。

図 3 に電流 (pA/pF) -電圧曲線を示した。Nav1.5 野生型に比べて、最大電流の発生する電位が脱分極側にシフトしている変異 (N406K, R1626P, G1631D, S1701P, D1790G) が、観察された。

LQT3 の発症に影響の大きい遅延電流の測定値 (-50 mV テスト電位における 50, 150, 250 ミリ秒の pA/pF 値をピーク電流 pA/pF で除した値) を図 4 に示した。Nav1.5 野生型の電流と比較して、N406K, L409F, Q1476R, R1623Q, R1626P, G1631D, M1653R, V1763M, S1710L, N1774D, D1790G, P2006A 変異で、遅延電流の増大が示された。

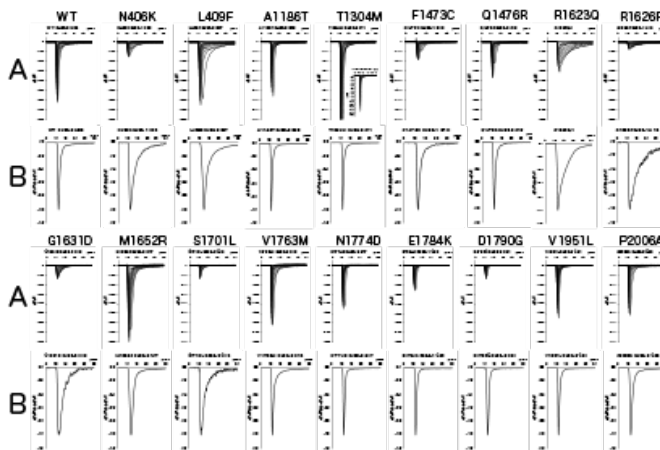


図2 Naチャンネル電流の波形

A; 保持電位-100mV、40mVまで10mVずつ間隔でテスト電位を与えた場合のNa電流値 (pA/pF)
B; テスト電位-50 mVのpA/pF/最小pA/pF

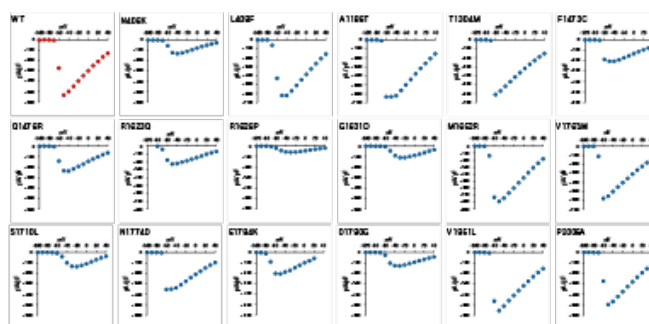


図3 Naチャンネル電流-電圧曲線

保持電位-100mV、+40mVまで10mV刻みのテスト電位を与えた場合のピークNa電流値 (最小pA/pF, 平均値)

遅延Na電流 (pA/pF / 最小pA/pF)

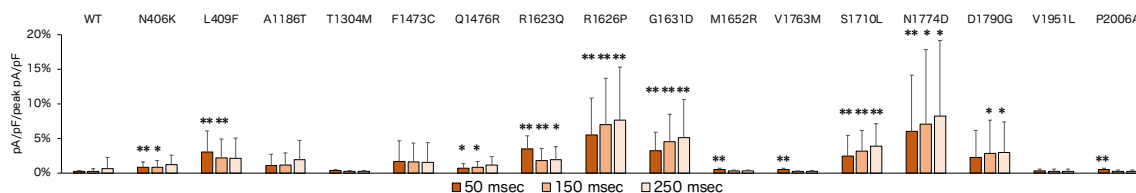


図4 遅延Na電流

テスト電位-50 mVにおける50, 150, 250 m秒のNa電流 (pA/pF/ピークpA/pF)
野生型 (WT) と変異型遅延電流値のT-test検定: *p<0.05, **p<0.01

(2) チャンネル複合体構成タンパク質と Nav1.5 の相互作用の検討

成人型 SCN5A は、ヒト成人右室に高発現した。電気生理学実験や遺伝子発現実験によく用いられる HEK293 細胞などには、SCN5A, CAV3, SNTA1 及び KCNJ2 はほぼ発現していないことが判明した (図 5)。興味深いことに、これらの測定対象試料において、CAV3 の発現は、SCN5A と相関性が高かった。

GFP 融合 $\alpha 1$ シントロフィリン、カベオリン 3、Kir2.1 タンパク質発現ベクターを 293T 細胞に

導入し、GFP 蛍光を検出した。導入後 3 日目の蛍光測定の結果を図 6 に示した。いずれも発現したが、 $\alpha 1$ シントロフィンやカベオリン 3 に比べて、Kir2.1 の発現は低かった。

N 末端に MYC タグを結合した *SNTA1*, *CAV3*, *KCNJ2* を Nav1.5 野生型及び一部の変異型の安定発現細胞株に導入し、タンパク質相互作用を免疫沈降法により検出した。野生型 Nav1.5 発現細胞に共発現し、Nav1.5 タンパク質に対する抗体を用いて免疫沈降し、抗 MYC タグ抗体により共発現タンパク質を検出した (図 7)。カベオリン 3 (17.3 kDa) と $\alpha 1$ シントロフィン (53.8 kDa) との結合は明瞭に検出できたが、Kir2.1 (48.3 kDa) との結合は検出されなかった。Kir2.1 は SAP97 を介して Nav1.5 と結合するとされることから、293T 細胞には SAP97 が乏しいと推測された。これまでに、L409F, A116T, T1304M, V1763M, V1951L 変異 Nav1.5 発現細胞と同様の免疫沈降実験を行ったが、いずれも野生型と同様、カベオリン 3 と $\alpha 1$ シントロフィンとの結合を確認した。Nav1.5 安定発現 293T 細胞と安定共発現するカベオリン 3 と $\alpha 1$ シントロフィンの細胞は、現在構築中である。

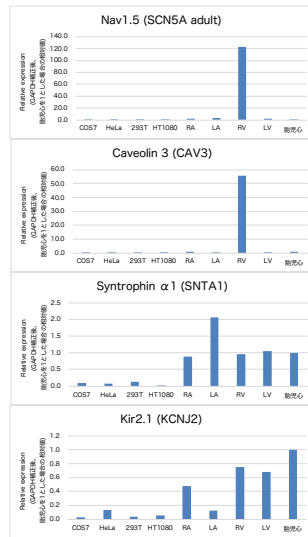


図5 成人型SCN5A, CAV3, SNTA1, KCNJ2 mRNAの発現

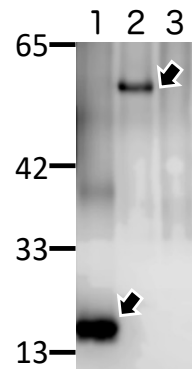


図7 野生型Nav1.5との相互作用
野生型Nav1.5安定発現293細胞に、1: カベオリン3, 2: シントロフィン, 3: Kir2.1を共発現し、免疫沈降法により、相互作用を確かめた。カベオリン3とシントロフィンは直接結合したが、Kir2.1は結合を検出できなかった。

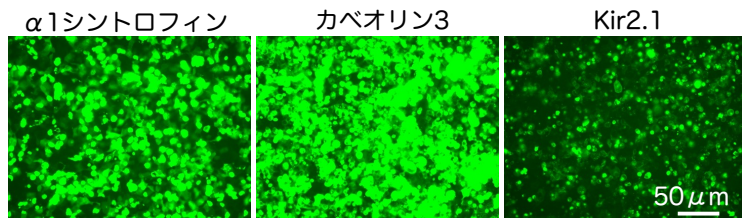


図6 Naチャネル複合体構成タンパク質を293T細胞に発現
GFP融合タンパク質発現ベクタ0.8 μ gにlipofectamine 2000 2 μ Lを添加し、293T細胞に導入して3日目に撮影した。

(3) Nav1.5 R1623Q 変異 iPS 細胞由来心筋細胞の機能解析及び生化学的分析

Nav1.5 R1623Q 変異を持つ患者並びに健常者の不死化 B 細胞に山中因子を導入し iPS 細胞を製作した (図 8a)。この iPS 細胞における SCN5A R1623Q 変異を確認した。LQT 関連遺伝子 (*KCNQ1*, *KCNH2*, *KCNE1*, *KCNE2*, *CACNA1C*) に特段の変異はなかった。TRA-1-60, SSEA4, OCT4 の発現を検出した (図 8b)。核型解析では染色体に変異はなかった (図 8c)。本 iPS 細胞からテラトーマが形成され、顕微鏡観察により内胚葉、中胚葉、外胚葉の 3 胚葉組織分化能を確かめた (図 8d)。

iPS 細胞を GSK3 阻害剤により Wnt シグナルを活性化し中胚葉細胞へ誘導し、続いて Wnt シグナル阻害剤により心筋細胞へ分化した。Day 8~10 で自発的に拍動する心筋前駆細胞を得、乳酸添加 (グルコース及びグルタミン無添加) で培養して心筋細胞の純化を行った。心筋分化の工程で、iPS 細胞マーカー (*Oct4*) と心筋細胞マーカー (*TNNT2*) の mRNA をリアルタイム PCR により検出測定したところ、*Oct4* の発現は Day 3 まで検出されたが、それ以降は BG レベルに低下し、*TNNT2* は、Day 6

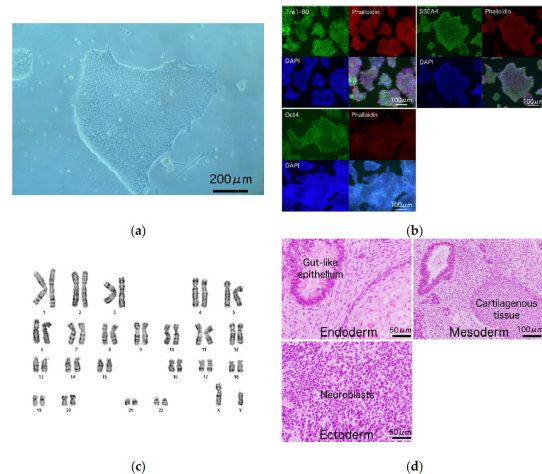


図8 R1623Q変異Nav1.5をもつ患者iPS細胞の樹立と品質チェック (a) iPS細胞コロニー, (b) 多分化能マーカーTra1-60, SSEA4, Oct4の蛍光抗体 (緑色) を用いた免疫的検出 (赤; アクチン繊維, 青; 細胞核), (c) 核型は正常, (d) SCIDマウスを用いたテラトーマ形成により、樹立iPS細胞の三胚葉組織への分化を確かめた。

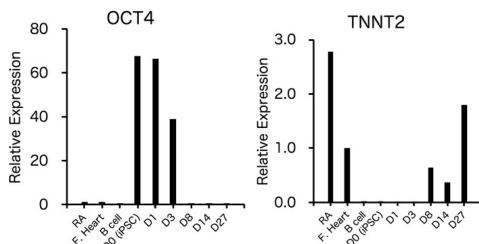


図9 iPS細胞から心筋細胞分化過程におけるOct4とTNNT2遺伝子発現 iPS多分化能マーカーOct4は次第に消失し、心筋細胞マーカーTNNT2 (トロポニンC) は次第に増加した。

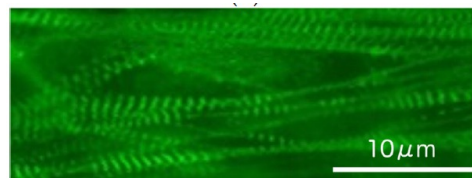


図10 iPS細胞から分化した心筋細胞に横紋筋構造を検出

以降に検出された (図 9)。また、アクチニンの免疫蛍光染色により、iPS-心筋細胞の横紋筋構造を検出した (図 10)。

マルチ電極アレイシステム (MED64) により、心電図の QT 間隔に該当する細胞外電位や拍動頻度を計測し、健常者と Nav1.5 R1623Q 変異をもつ患者由来 iPS-心筋細胞を比較した (図 11)。R1623Q 変異細胞では、健常者細胞に比べて、心電図の QT 幅に相当する FPD (細胞外電位持続時間, Field potential Duration) の増加が見られた (図 11a)。心拍数を補正する Fridericia 式を用いて $FPDcF = FPD / (\text{interspike interval})^{1/3}$ を求めた。健常に比べて R1623Q 変異で有意に FPDcF 値は増加していた (図 11b)。

MED システムをにより、患者の治療に用いられたメキシレチンを iPS-心筋細胞層に添加し、薬理的検討を行った。図 11c 左のグラフは、図 11a のグラフの波形の 20~80 msec 部分を拡大したものである。メキシレチンを添加すると、ナトリウムチャネルの活動による Na の流入に依存するスパイクが小さくなった。R1623Q 変異細胞では健常者細胞に比べてメキシレチンによる Na チャネル阻害効果が大きかった (図 11c)。また、R1623Q 変異では、メキシレチンにより、濃度依存的に BPM 値の低下がみられた (図 11d)。このように、iPS-心筋細胞は、薬理学的効果を測定する目的でも有用であった。

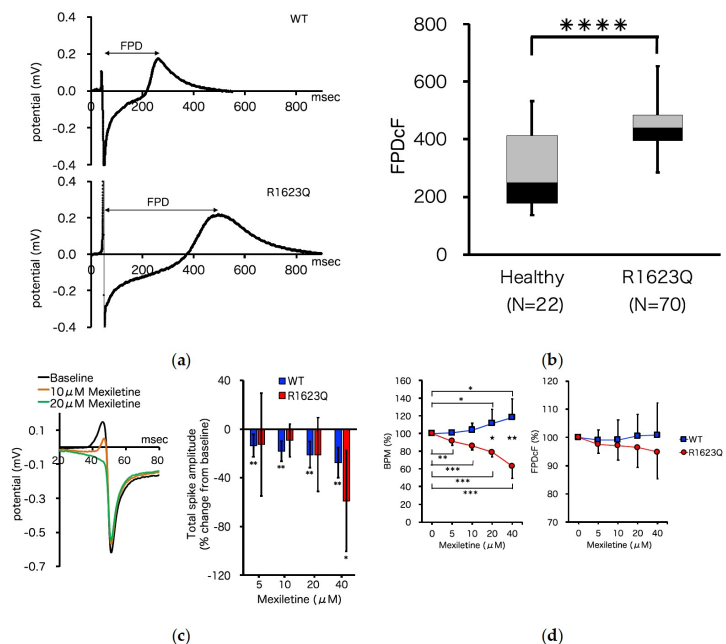


図11 iPS分化心筋細胞の電気生理学的解析

(a) 野生型に対してR1623Q変異では、QT幅に対応するFPD幅が延長した。(b) 拍動数を用いて補正したFPDcF値は、R1623Q変異で有意に増大していた。(c) MED測定時にメキシレチンを添加すると、濃度依存的にNa電流を示すスパイク長の短縮が検出され、(d) 野生型ではBPMが増加したが、R1623Q変異では低下した。

<引用文献>

1. Abriel, H., Rougier, J. S., and Jalife, J. (2015) Ion channel macromolecular complexes in cardiomyocytes: roles in sudden cardiac death *Circ Res* **116**, 1971-1988 10.1161/CIRCRESAHA.116.305017
2. 堀米仁志, and 吉永正夫 (2018) 乳児期発症先天性 QT 延長症候群 (LQTS) と乳児突然死症候群にみられる LQTS 関連遺伝子変異の比較 *循環器専門医* **26**, 7,
3. Herren, A. W., Bers, D. M., and Grandi, E. (2013) Post-translational modifications of the cardiac Na channel: contribution of CaMKII-dependent phosphorylation to acquired arrhythmias *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **305**, H431-445 10.1152/ajpheart.00306.2013
4. Okata, S., Yuasa, S., Suzuki, T., Ito, S., Makita, N., Yoshida, T. *et al.* (2016) Embryonic type Na(+) channel beta-subunit, SCN3B masks the disease phenotype of Brugada syndrome *Sci Rep* **6**, 34198 10.1038/srep34198
5. Lian, X., Zhang, J., Azarin, S. M., Zhu, K., Hazeltine, L. B., Bao, X. *et al.* (2013) Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/beta-catenin signaling under fully defined conditions *Nat Protoc* **8**, 162-175 10.1038/nprot.2012.150

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 1件）

1. 著者名 Hayama Emiko, Furutani Yoshiyuki, Kawaguchi Nanako, Seki Akiko, Nagashima Yoji, Okita Keisuke, Takeuchi Daiji, Matsuoka Rumiko, Inai Kei, Hagiwara Nobuhisa, Nakanishi Toshio	4. 巻 10
2. 論文標題 Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes with SCN5A R1623Q Mutation Associated with Severe Long QT Syndrome in Fetuses and Neonates Recapitulates Pathophysiological Phenotypes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 1062 ~ 1062
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biology10101062	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0件

〔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
研究分担者	羽山 恵美子 (Hayama Emiko) (00349698)	東京女子医科大学・医学部・非常勤講師 (32653)	
研究分担者	古谷 喜幸 (Furutani Yoshiyuki) (10424673)	東京女子医科大学・医学部・非常勤講師 (32653)	
研究分担者	中西 敏雄 (Nakanishi Toshio) (90120013)	東京女子医科大学・医学部・研究生 (32653)	

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