

QT 延長症候群 1 型スプライシング異常症例におけるヒト iPS 細胞由来分化心筋細胞を用いた解析

研究分担者 牧山 武 京都大学大学院医学研究科 循環器内科学 助教

研究要旨

ヒト人工多能性幹 (induced pluripotent stem: iPS) 細胞は、移植治療、疾患の病態解明への有用性が期待されている。今回、我々は、QT延長症候群1型スプライシング異常症例 (KCNQ1-A344A) において、疾患特異的iPS細胞を用いた疾患表現型の再現、スプライシング異常のメカニズムに関して解析した。多電極アレイを用いた電気生理学的解析では、カテコラミン負荷による反応が分化心筋にて再現できた。また、スプライシング異常に関しては、末梢血リンパ球の解析では認められなかった新たな異常なスプライシングパターンを検出した。このような疾患特異的iPS細胞を用いた解析方法は、今まで困難であったヒト心筋での解析が可能となり、新たな知見が得られる有用な方法であると考えられた。

A. 研究目的

ヒト人工多能性幹 (induced pluripotent stem: iPS) 細胞は、移植治療、疾患の病態解明への有用性が期待され、特に分化心筋を用いることにより、ヒト心筋での解析が可能となる有力な tool である。今回、我々は、QT 延長症候群 1 型スプライシング異常症例において、表現型の再現、スプライシングメカニズムの検討を行った。

B. 研究方法

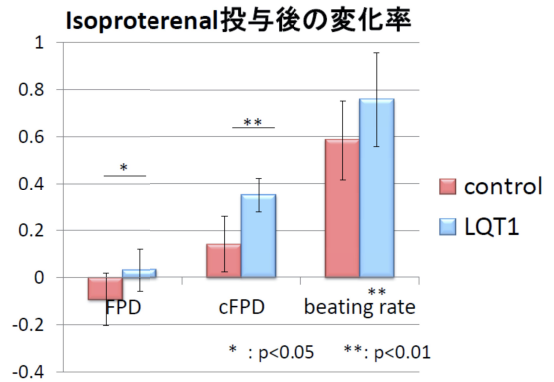
心肺蘇生歴のある QT 延長症候群 1 型、KCNQ1-A344A ヘテロ異常の検出されている患者の末梢血リンパ球に山中 4 因子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC 遺伝子) を electroporation 法にて導入し、iPS 細胞を作製した。胚様体形成法 (Yang et al. Nature 2008) を用いて心筋分化し、電気生理学的解析として、多電極アレイ (multielectrode array) を用いた。また、スプライシングパターンをみるため、分化心筋より RNA 抽出、cDNA を作製し、TA クローニング法を用い、cDNA のクローニング、シーケンシングによる塩基配列の解析を行った。

C. 研究結果

<多電極アレイを用いた電気生理学的解析>

心筋分化開始後、6週±2週のヒトiPS細胞由来分化心筋を用いて多電極アレイを用いた電気生理学的解析を行った。図1のように、isoproterenol 1μM負荷にて、健常人iPS細胞由来分化心筋に比べ、QT間隔に相当するcFPD値の有意な増加を認め、LQT1の表現型が再現されていることが確認できた。

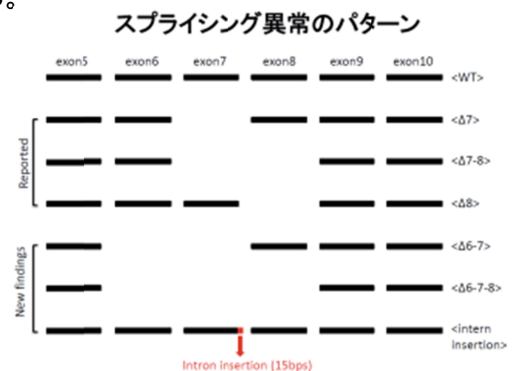
図1



<スプライシングパターンの解析>

KCNQ1-A344Aはexon 7の最後の塩基がGからAに変化する異常であり、以前、我々は、患者末梢血リンパ球を用いた解析で、3つのtypeのexon skipping (exon7, 7-8, 8 skipping)が生じていることを報告した。(Tsuji et al. JMCC 2007) 患者iPS細胞由来分化心筋を用いた解析では、図2のように新たに3つの異常なスプライシングパターン (exon 6-7, 6-7-8 skipping, intron insertion) が検出された。現在、各 splicing産物の定量、I_{Ks}電流減少への影響を検討している。

図2



D . 考察

本研究において、ヒト iPS 細胞由来分化心筋を用いた LQT1 の表現型の再現、疾患発症メカニズムの解析を行った。多電極アレイを用いた解析にて表現型が再現されるのを確認し、発症メカニズムの解明として、既存の血液検体の解析では検出できなかった新たな異常スプライシングパターンを分化心筋を用いて検出できた。以上の知見は新たな解析 tool であるヒト iPS 細胞の有用性を示すものであり、今後さらなる応用が期待される。

E . 結論

ヒト iPS 細胞由来分化心筋を用いた LQT1 症例の解析にて既存の末梢血を用いた解析では検出できなかった新たなスプライシング異常に関する知見が明らかとなった。今後のヒト iPS 細胞のさらなる応用が期待される。(本研究は第 78 回日本循環器学会学術集會にて発表予定)

G . 研究発表

1 . 論文発表

1. 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.
 2. 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*. 2013
 3. 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*. 2013 S1547-5271(13)01136-3.
 4. Nakajima S, Makiyama T, Hanazawa K, Kaitani K, Amano M, Hayama Y, Onishi N, Tamaki Y, Miyake M, Tamura T, Kondo H, Motooka M, Izumi C, Nakagawa Y, Horie M. A novel SCN5A mutation demonstrating a variety of clinical phenotypes in familial sick sinus syndrome. *Intern Med*. 2013;52(16):1805-8.
 5. Kawamura M, Ohno S, Naiki N, Nagaoka I, Dochi K, Wang Q, Hasegawa K, Kimura H, Miyamoto A, Mizusawa Y, Itoh H, Makiyama T, Sumitomo N, Ushinohama H, Oyama K, Murakoshi N, Aonuma K, Horigome H, Honda T, Yoshinaga M, Ito M, Horie M. Genetic background of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in Japan. *Circ J*. 2013;77(7):1705-13.
 6. Fukuyama M, Ohno S, Wang Q, Kimura H, Makiyama T, Itoh H, Ito M, Horie M. L-type calcium channel mutations in Japanese patients with inherited arrhythmias. *Circ J*. 2013;77(7):1799-806.
 7. Ohno S, Nagaoka I, Fukuyama M, Kimura H, Itoh H, Makiyama T, Shimizu A, Horie M. Age-dependent clinical and genetic characteristics in Japanese patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Circ J*. 2013;77(6):1534-42.
 8. Villafañe J, Atallah J, Gollob MH, Maury P, Wolpert C, Gebauer R, Watanabe H, Horie M, Anttonen O, Kannankeril P, Faulknier 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;61(11):1183-91.
 9. Ishikawa T, Takahashi N, Ohno S, Sakurada H, Nakamura K, On YK, Park JE, Makiyama T, Horie M, Arimura T, Makita N, Kimura A. Novel SCN3B mutation associated with brugada syndrome affects intracellular trafficking and function of Nav1.5. *Circ J*. 2013;77(4):959-67.
 10. 牧山 武: イオンチャネル病のすべて. 各論. QT短縮症候群. (分担), 『医学のあゆみ』(堀江 稔編集): p. 773-780, 南江堂, 2013
 11. 牧山 武: 致死性不整脈診療の最前線. 致死性不整脈診療 各論. 家族性徐脈症候群. (分担), 『最新医学』: 68号7巻, 最新医学社, 2013
 12. 牧山 武: 疾患特異的iPS細胞を用いた遺伝性心疾患研究. 心電図 vol 33. Supple 3. 2013
- ### 2 . 学会発表
1. Sasaki K, Makiyama T et al.: 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, 10.16-20, 2013
 2. Yimin W, Makiyama T et al.: Identification of Cardiomyocytes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells using a Cardiac Specific Promoter Lentiviral Vector, The 6th Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHRs) Scientific

- Session, Hong Kong, China, 10.3-6, 2013.
3. Chen Jiarong, Makiyama T et al.: Cardiac sodium channel mutation may induce epinephrine/exercise triggered QT prolongation, The 6th Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHRS) Scientific Session, Hong Kong, China, 10.3-6, 2013.
 4. Nishiuch H, Makiyama T et al.: Lamin A/C Related Cardiomyopathy due to the R377R Synonymous Mutation Causing the Splicing Abnormality, The 6th Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHRS) Scientific Session, Hong Kong, China, 10.3-6, 2013.
 5. Harita T, Makiyama T et al.: SCN5A mutations associated with familial atrial fibrillation without structural heart diseases, The 6th Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHRS) Scientific Session, Hong Kong, China, 10.3-6, 2013.
 6. Hayano M, Makiyama T et al.: SCN5A mutations associated with Dilated Cardiomyopathy, The 6th Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHRS) Scientific Session, Hong Kong, China, 10.3-6, 2013.
 7. 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
 8. Yimin W, Makiyama T et.: Modeling of long-QT syndrome type 1 caused by a splicing mutation using human iPS cells, 第 78 回日本循環器学会学術集会, 東京, 3.21-23, 2014
 9. Nishiuch H, Makiyama T et al.: 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
 10. Harita T, Makiyama T et al.: The Association Between the Hereditary Factor of Atrial Fibrillation and the Recurrent Atrial Arrhythmias after Catheter Ablation Therapy, 第 78 回日本循環器学会学術集会, 東京, 3.21-23, 2014
 11. Hayano M, Makiyama T et al.: Cardiac Na⁺ Channel Gene Mutations associated with Dilated Cardiomyopathy, 第 78 回日本循環器学会学術集会, 東京, 3.21-23, 2014
 12. Sasaki K, Makiyama T et al.: Modeling Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia using Human Induced Pluripotent Stem Cells: A Promising Tool for Drug Discovery, 第 78 回日本循環器学会学術集会, 東京, 3.21-23, 2014
 13. Yamamoto Y, Makiyama T et al.: Electrophysiological characteristics of human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes in a Long-Term culture, 第 78 回日本循環器学会学術集会, 東京, 3.21-23, 2014
- H . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
- 1 . 特許取得
なし
 - 2 . 実用新案登録
なし
 - 3 . その他
なし

