

京都大学	博士 ( 医 学 )	氏 名	柏 麻美
論文題目	<p>Disrupted Cav1.2 Selectivity Causes Overlapping Long QT and Brugada Syndrome Phenotypes in <i>CACNA1C</i>-E1115K iPS Cell Model  (CACNA1C-E1115K 変異ヒト iPS 細胞モデルにおける Cav1.2 イオン選択性障害が QT 延長症候群・ブルガダ症候群のオーバーラップを引き起こすメカニズムの検討)</p>		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>心臓 L 型 Ca<sup>2+</sup>チャネル (LTCC) α サブユニット (Cav1.2) は、<i>CACNA1C</i> 遺伝子によりコードされ、チャネル孔に位置するグルタミン酸 (E) による「EEEE リング」がチャネルの Ca<sup>2+</sup>選択性に重要な役割を果たしている。近年、このイオンフィルター部位のヘテロ接合性ミスセンス変異 (<i>CACNA1C</i>-E1115K) が、QT 延長症候群 (LQTS)、ブルガダ症候群 (BrS) の異なる 2 家系で報告され、培養細胞を用いた過剰発現系において変異 LTCC の Ca<sup>2+</sup>選択性障害が示されたが、疾患発症機序は明らかではない。本研究では、<i>CACNA1C-E1115K</i> による LTCC の Ca<sup>2+</sup>選択性障害が多彩な不整脈疾患を引き起こす病態機序の解明を目的とし、患者由来 iPS 細胞、<i>in silico</i> 心室筋細胞モデルを用いた解析を行った。発端者は LQTS、BrS を呈する 12 歳男性。母は LQTS、心機能低下を呈し、母子より、ヘテロ <i>CACNA1C-E1115K</i> を同定した。発端者より iPS 細胞を樹立し、コントロールとして、健常人由来 iPS 細胞株、CRISPR/Cas9 システムを用い遺伝子変異修復したゲノム編集 iPS 細胞株を用いた。パッチクランプ法を用いた電気生理学的機能解析では、患者 iPS 細胞由来心筋細胞 (EK-CM) において、LTCC の Ca<sup>2+</sup>選択性障害 (Ca<sup>2+</sup>電流密度の低下と一価陽イオンの透過性亢進) を認めた。活動電位記録では、EK-CM において、有意な活動電位持続時間 (APD) の延長、早期後脱分極の頻度増加、活動電位第 1 相からプラトー相の膜電位低下を認め、LQTS と BrS のオーバーラップの表現型に一致する結果であった。膜電位イメージングを用いた薬効評価では、LTCC 拮抗薬 (ニフェジピン) が、EK-CM において有意に APD を短縮し、変異 LTCC を流れる内向き Na<sup>+</sup>電流が APD 延長に起因すると考えられた。また近年、異なる遺伝子型の LQTS で、心臓 Na<sup>+</sup>チャネル (Nav1.5) 内向き遅延 Na<sup>+</sup>電流 (I<sub>NaL</sub>) 阻害による QT 短縮効果が報告されており、同作用を有すメキシレチン、より選択性の高い GS-458967 を投与すると、EK-CM において、有意な APD 短縮を認めた。EK-CM での I<sub>NaL</sub> の増強が示唆されたことから、活動電位波形の変化が I<sub>NaL</sub> 増大に関与するか検討するため、コントロールと EK-CM の活動電位でそれぞれ膜電位を固定し、I<sub>NaL</sub> 記録を行うと (AP-clamp)、APD 延長と低波高を呈する EK-CM の活動電位下で有意に I<sub>NaL</sub> が増大した。<i>in silico</i> ヒト心室筋細胞モデルを用いた解析でも、EK-CM モデルにおける I<sub>NaL</sub> 増大が再現され、<i>in vitro</i> 解析の結果と一致した。以上より、EK-CM では、変異 LTCC の Ca<sup>2+</sup>選択性障害により、活動電位波形の変化 (波高の低下、APD 延長) が生じ、この波形の変化が二次的に野生型 Nav1.5 の I<sub>NaL</sub> を増大させ、さらなる APD 延長を来し、催不整脈性を増強すると考えられた。I<sub>NaL</sub> は、心筋虚血や心不全により亢進し催不整脈性を持つことが知られ、その阻害薬は陰性変力作用を有さず低左心機能例に投与可能であり注目されている。本研究成果より、I<sub>NaL</sub> 阻害薬は <i>CACNA1C-E1115K</i> 変異症例の不整脈治療薬候補となり、患者診療への寄与が期待される。また、iPS 細胞由来心筋細胞は、幼若心筋細胞であることが課題であるが、本研究における <i>in silico</i> モデルの併用は、成熟心筋細胞での再現性を支持し、複雑な不整脈疾患の病態研究において有用であると考えられる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

心臓 L 型 Ca<sup>2+</sup>チャネル (LTCC) α サブユニットは、*CACNA1C* 遺伝子によりコードされ、チャネル孔に位置するグルタミン酸 (E) による「EEEE リング」が、チャネルの Ca<sup>2+</sup>選択性に重要な役割を果たす。

本研究では、このイオンフィルター部位のヘテロミスセンス変異 (*CACNA1C*-E1115K) が、QT 延長症候群、ブルガダ症候群を引き起こす発症機序を解明することを目的とし、患者 iPS 細胞、*in silico* 心室筋細胞モデルを用いた検討を行った。患者由来 iPS 細胞由来心筋細胞において、変異 LTCC の Ca<sup>2+</sup>選択性障害により、活動電位波形の変化 (波高の低下、活動電位持続時間 (APD) 延長) が生じ、QT 延長症候群とブルガダ症候群がオーバーラップした表現型に一致する特徴を示した。

さらに、活動電位クランプ法を用いた解析により、活動電位波形の変化が、二次的に野生型心臓 Na<sup>+</sup>チャネルの遅延 Na<sup>+</sup>電流 (I<sub>NaL</sub>) を増大させ、さらなる APD 延長による催不整脈性を増強することを明らかにし、*in silico* ヒト心室筋細胞モデルを用いた解析においても同様の結果であった。また、E1115K-iPS 細胞由来心筋細胞において、I<sub>NaL</sub> 阻害薬が、APD 短縮、活動電位オルタナンス抑制などの抗不整脈効果を示すことを明らかにした。

以上の研究は遺伝性不整脈疾患の発症機序解明に貢献し、新たな治療法開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 ( 医学 ) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 5 年 1 月 17 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降