

# Calmodulinopathy (カルモジュリン遺伝子関連不整脈疾患): iPS細胞技術を用いた疾患モデルの作製と遺伝子治療へのアプローチ

山本雄大\* 牧山 武

カルモジュリンは普遍的に発現しているCa<sup>2+</sup>センサータンパクであり、3つの異なる遺伝子(CALM1-3)によりコードされている。近年、これらCALM遺伝子の変異によって先天性QT延長症候群(congenital long-QT syndrome: LQTS)やカテコラミン誘発性多形性心室頻拍(catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: CPVT)などの致死性不整脈疾患が引き起こされることが報告され、注目されている。このようなCalmodulinopathyは、CALM遺伝子のヘテロミスセンス変異によって引き起こされることが報告されているが、その疾患発症機序の詳細は不明である。われわれは、カルモジュリン遺伝子関連LQTS患者より樹立したiPS細胞を用いて疾患モデルを確立し、ヒト心筋における疾患発症機序の解明とゲノム編集技術を用いた新規治療法の開発を目的とした研究を行っており、カルモジュリン遺伝子異常と不整脈疾患に関する最新の知見と併せて紹介する。

(心電図, 2019; 39: 273~282)

## I. カルモジュリン遺伝子変異による不整脈疾患: “Calmodulinopathy”

先天性QT延長症候群(congenital long-QT syndrome: LQTS)は、心電図上、QT間隔の延長を特徴とし、torsade de pointesと呼ばれる多形性心室頻拍による失神や突然死を引き起こしうる致死性遺伝性不整脈疾患である。心臓イオンチャネルやチャネル機能を制御するタンパクをコードする遺伝子の変異により、心筋細胞の再分極遅延が引き起こされることが原因であり、責任遺伝子により現在

**Keywords**

- QT延長症候群
- iPS細胞
- カルモジュリン
- ゲノム編集
- 遺伝子治療

京都大学医学部附属病院循環器内科  
 (〒606-8507 京都府京都市左京区聖護院川原町54)  
 \*は責任者を示す

*Calmodulinopathy—Analysis of Human iPS Cell Model of Long-QT Syndrome with a CALM2 Mutation and Therapeutic Approach Using Genome Editing Technology—*  
 Yuta Yamamoto, Takeru Makiyama

2019年4月1日 原稿受領 / 2019年5月24日 掲載承認

15のサブタイプに分類される<sup>1)</sup>。近年、カルモジュリンをコードする *CALM* 遺伝子の変異によって LQTS (LQT14, 15) が引き起こされることが報告された。

カルモジュリン(calmodulin)はその名の通り、カルシウム(calcium)によって調整(modulated)されるタンパク(protein)であり、高等生物の細胞に普遍的に存在し、カルシウム濃度を検知し立体構造の変化を生じる。カルモジュリンは、イオンチャネルや筋小胞体に存在するリアノジン受容体(RyR2)、カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ(CaMK II)をはじめ、300種類以上のタンパクの機能を調節しているといわれている<sup>2)</sup>。カルモジュリンは進化を通じて高度に保存されており、すべての脊椎動物においてそのアミノ酸配列は完全に同一であるとされ、ヒトにおいてはそれぞれ独立した3つの遺伝子(*CALM1-3*)が、まったく同一のカルモジュリンタンパクをコードしている。このようにカルモジュリンは多くのタンパクの機能制御にかかわり、種を越えて配列が高度に保存されているため、従来、*CALM* 遺伝子の異常は致死的になると考えられてきた。

しかし、2012年、Nyegaardらは、スウェーデンのカテコラミン誘発性心室頻拍(catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia : CPVT)の家系において *CALM1* 遺伝子変異を検出し、変異カルモジュリンタンパクの解析により、本変異が発症原因であることを報告した<sup>3)</sup>。さらに、2013年に Crottiらによって *CALM1*, *CALM2* 遺伝子変異によって重篤な LQTSが<sup>4)</sup>、2014年に Marsanらによって *CALM1* 遺伝子変異によって特発性心室細動(idiopathic ventricular fibrillation : IVF)が引き起こされることが報告された<sup>5)</sup>。このように、カルモジュリン遺伝子異常により引き起こされる致死性不整脈疾患は総じて“Calmodulinopathy”と呼称され、現在、70症例ほどが報告されている。本邦においても、2014年の Makitaらの報告をはじめとして、複数の症例が報告されており<sup>6)~8)</sup>、新たな疾患概念として注目を浴びている。当初、*CALM* 遺伝子変異

は大家系で報告されたが<sup>3)</sup>、その後には報告されている症例の大部分が両親に変異を認めない“de novo 症例”であることも興味深い点であり、おそらく症状が重篤で若年の致死性不整脈イベントが多いことと関連していると推察される。

Calmodulinopathyは LQTS, CPVT 等の表現型を示し、若年発症で予後不良な症例が多いが、その治療法はおろか、詳細な発症機序に関しても不明な点が多く、早急な解明が望まれている。カルモジュリンの多彩な役割から、疾患発症機序には多くのタンパクがかかわりうることが推測され、特に L型  $Ca^{2+}$  チャネル(LTCC)と RyR2は心筋細胞における活動電位形成や  $Ca^{2+}$  ハンドリングに重要な役割を果たしており、これら2つのイオンチャネルとの関連を中心に研究が進められている。

## II. カルモジュリン遺伝子関連 LQTS-iPS 細胞モデルの確立とゲノム編集技術を用いた新規治療法の検討

われわれは、Calmodulinopathyの一つであるカルモジュリン遺伝子関連 LQTSの疾患発症機序解明と新規治療法開発を目的とし、*CALM2* 遺伝子変異をもつ LQTS患者より樹立した iPS細胞を用いた検討を行ったので詳細を紹介する<sup>9)</sup>。治療法開発に関して、Calmodulinopathyは3つの *CALM* 遺伝子のうち、1つの遺伝子のヘテロ変異のみで重篤な表現型を示すことから、その発症機序にドミナントネガティブ効果が示唆されている(図1)。われわれはこの点に着目し、変異アレルを特異的にノックアウトすることにより表現型が改善できるのではないかと考え、ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療を試みた。

### 1. 実験方法と結果

#### ①患者由来 iPS細胞の樹立

遺伝子検査により *CALM2* 遺伝子に変異を検出した LQTS (LQT15)の12歳男児の末梢血単核細胞よりエピソーマルベクターを用いた方法により、リプログラミング因子の導入を行い、iPS細胞(iPSC)を樹立した(LQT15-iPSC)<sup>10)</sup>。患者には失神の既往歴

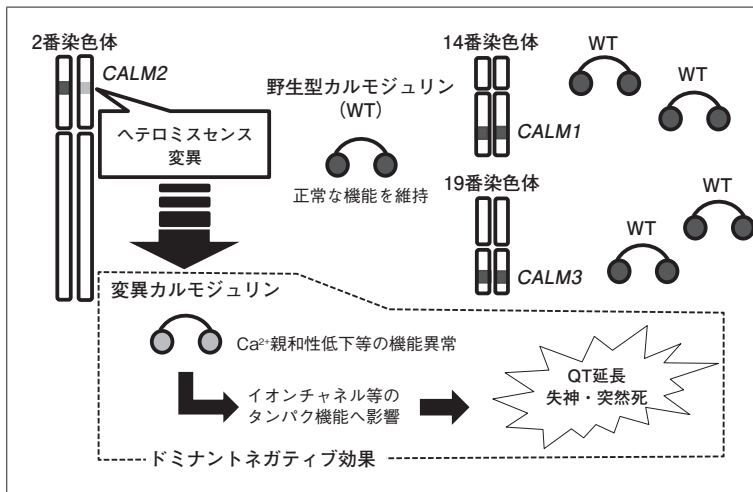


図1 Calmodulinopathyの発症機序  
6つのアレルのうち5つより正常なカルモジュリンが発現しているにもかかわらず、1つのアレルより発現する変異カルモジュリンにより、重篤な表現型が引き起こされる。

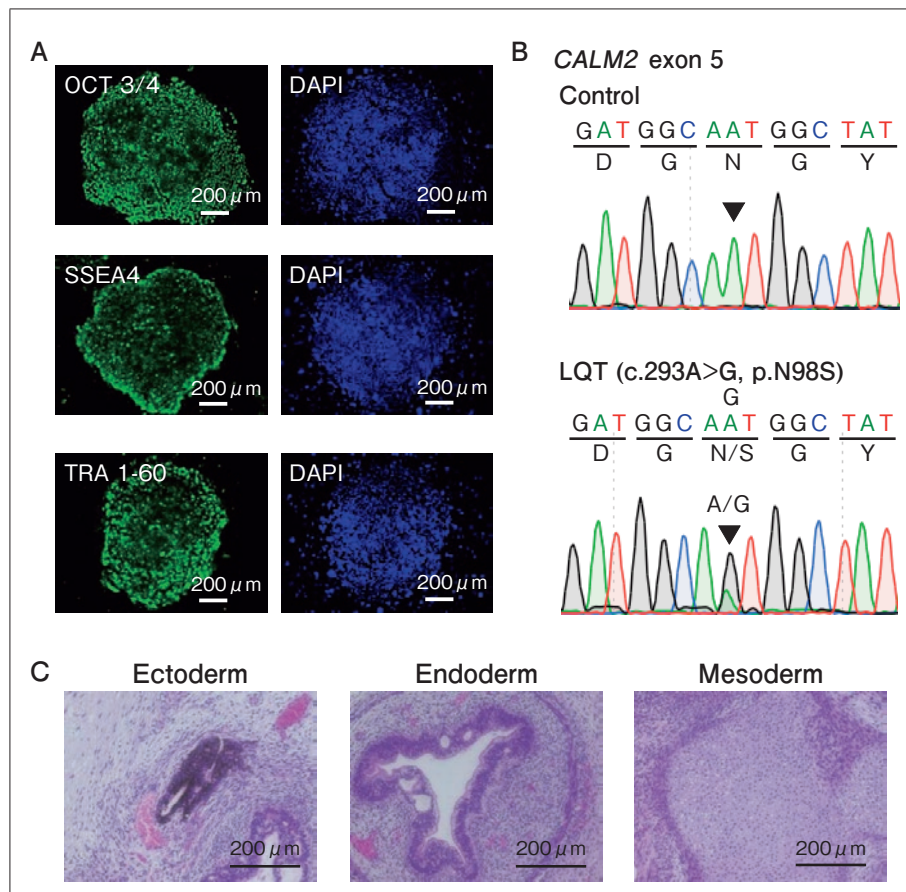


図2 LQT15-iPSC細胞(LQT15-iPSC)樹立

- A: 免疫染色により、LQT15-iPSCは多能性マーカーを発現していることを確認した。  
B: LQT15-iPSCにおいて、患者と同様に *CALM2*-N98S変異を確認した。  
C: LQT15-iPSCを免疫不全マウスの精巣に移植し、作製したテラトーマのヘマトキシリンエオシン染色。3つの胚葉由来の組織が確認された。メラノサイト(左:外胚葉)、消化管様構造(中央:内胚葉)、軟骨組織(右:中胚葉)。

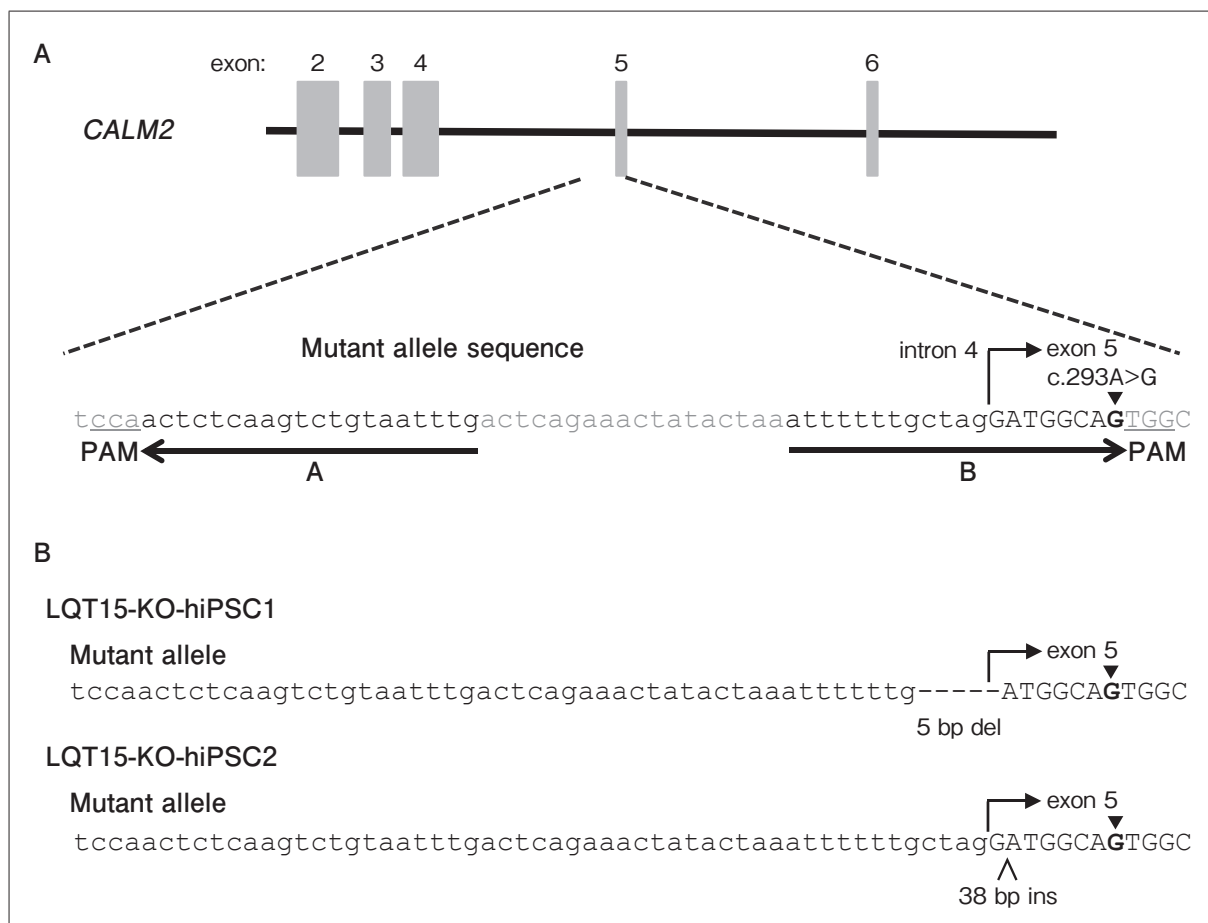


図3 LQT15-iPSCにおける変異アレル特異的ノックアウトクローン作製

- A: 変異アレル特異的ノックアウトクローン作製のためのガイドRNA設計. 大文字は *CALM2* 遺伝子のエクソン5, 下線部はPAM配列, 太字は変異部分を示す.
- B: LQT15-KO-iPSCのシーケンス. 2つのゲノム編集されたクローンは, 塩基挿入・欠失によりフレームシフトが起こり, ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構により変異タンパクが発現しないと予測される.

があり, 安静時の心電図検査において徐脈と軽度のQT間隔延長, エピネフリン負荷試験においては著明なQT間隔延長が認められた. 不整脈や突然死の家族歴は認められなかった<sup>6)</sup>. コントロールとして健康人より樹立したiPS細胞を用いた. 今回樹立したLQT15-iPSCは免疫染色において, iPS細胞に特徴的な多能性マーカーを発現しており, 抽出したゲノムのシーケンシング解析にて患者と同様の変異(*CALM2*-N98S)を確認した(図2A, B). また, テラトマ試験において多分化能が保持されているのを確認した(図2C).

## ②ゲノム編集技術を用いた変異アレル特異的ノックアウトクローンの作製

変異カルモジュリンをノックアウトするため, CRISPR-Cas9システムのなかでもオフターゲット効果が少ないダブルニッカーゼシステムを用いた. ウェブプログラム(<http://crispr.mit.edu/>)を用いてガイドRNAの配列を決定し(図3A), 患者より樹立したLQT15-iPSCにゲノム編集を行い, 2つの変異アレル特異的ノックアウトクローン(LQT15-KO)を樹立した(図3B). 樹立したクローンにおいて, オフターゲット候補上位5つの配列を確認したが,

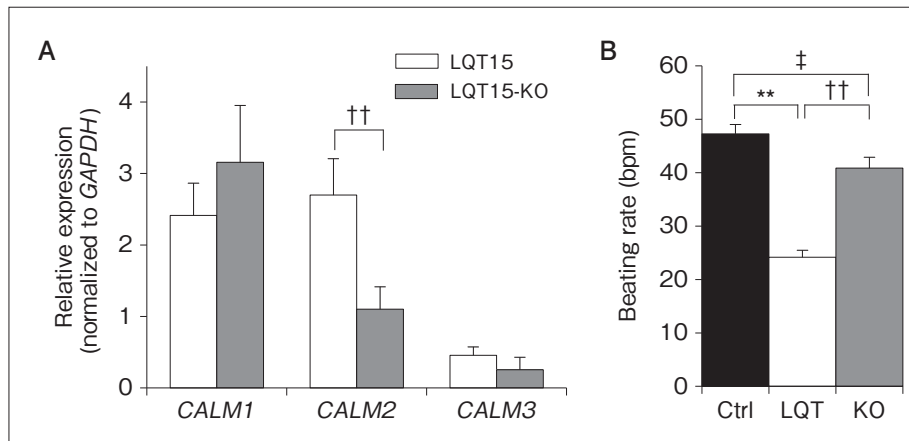


図4 CALM遺伝子発現と胚様体における拍動数

A: QPCRによるLQT15-iPSC (n = 5)とLQT15-KO (n = 4)の胚様体におけるCALM1-3の遺伝子発現.  $^{\dagger}p < 0.01$ .  
 B: Control (n = 58), LQT15 (n = 62), LQT15-KO (n = 62)の胚様体における拍動数.  $^{**}p < 0.01$  (Control vs. LQT15).  
 $^{\dagger}p < 0.01$  (LQT15 vs. LQT15-KO).  $^{\ddagger}p < 0.05$  (LQT15-KO vs. Control).

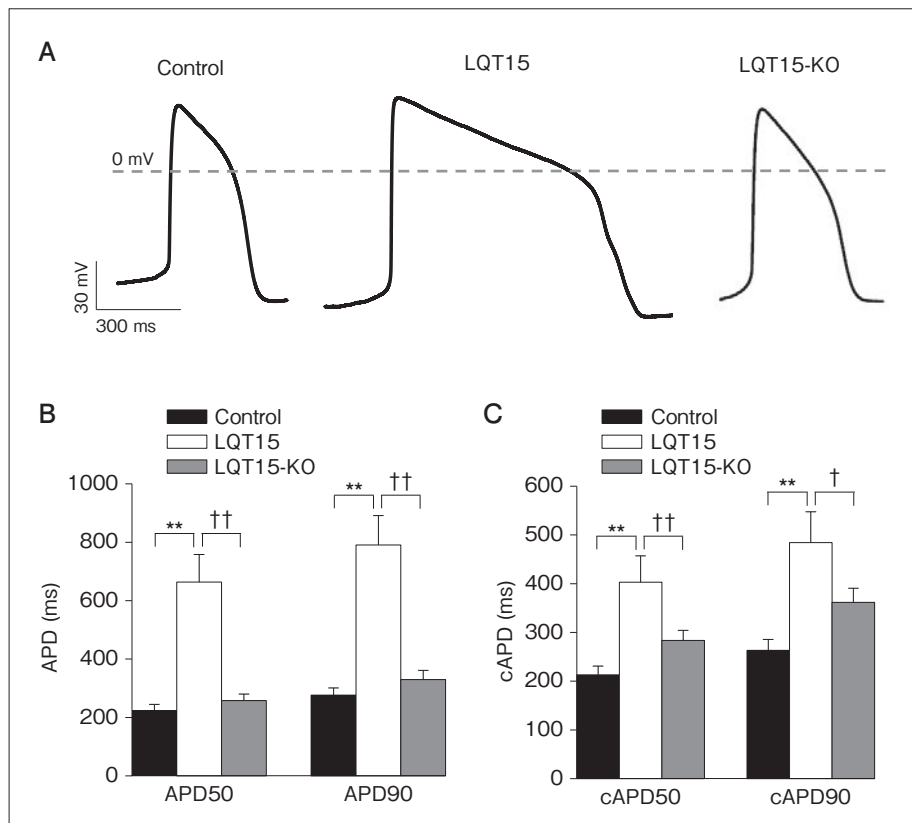


図5 パッチクランプ法を用いた分化心筋における活動電位記録

A: 各クローンにおける心室筋タイプに分類された活動電位波形の代表波形.  
 B: 活動電位持続時間(50%再分極時間と90%再分極時間) (Control: n = 11, LQT15: n = 8, LQT15-KO: n = 11).  $^{**}p < 0.01$  (Control vs. LQT15).  $^{\dagger}p < 0.01$  (LQT15 vs. LQT15-KO).  
 C: 拍動数を用いて補正した活動電位持続時間.  $^{**}p < 0.01$  (Control vs. LQT15).  $^{\dagger}p < 0.05$ ,  $^{\ddagger}p < 0.01$  (LQT15 vs. LQT15-KO).

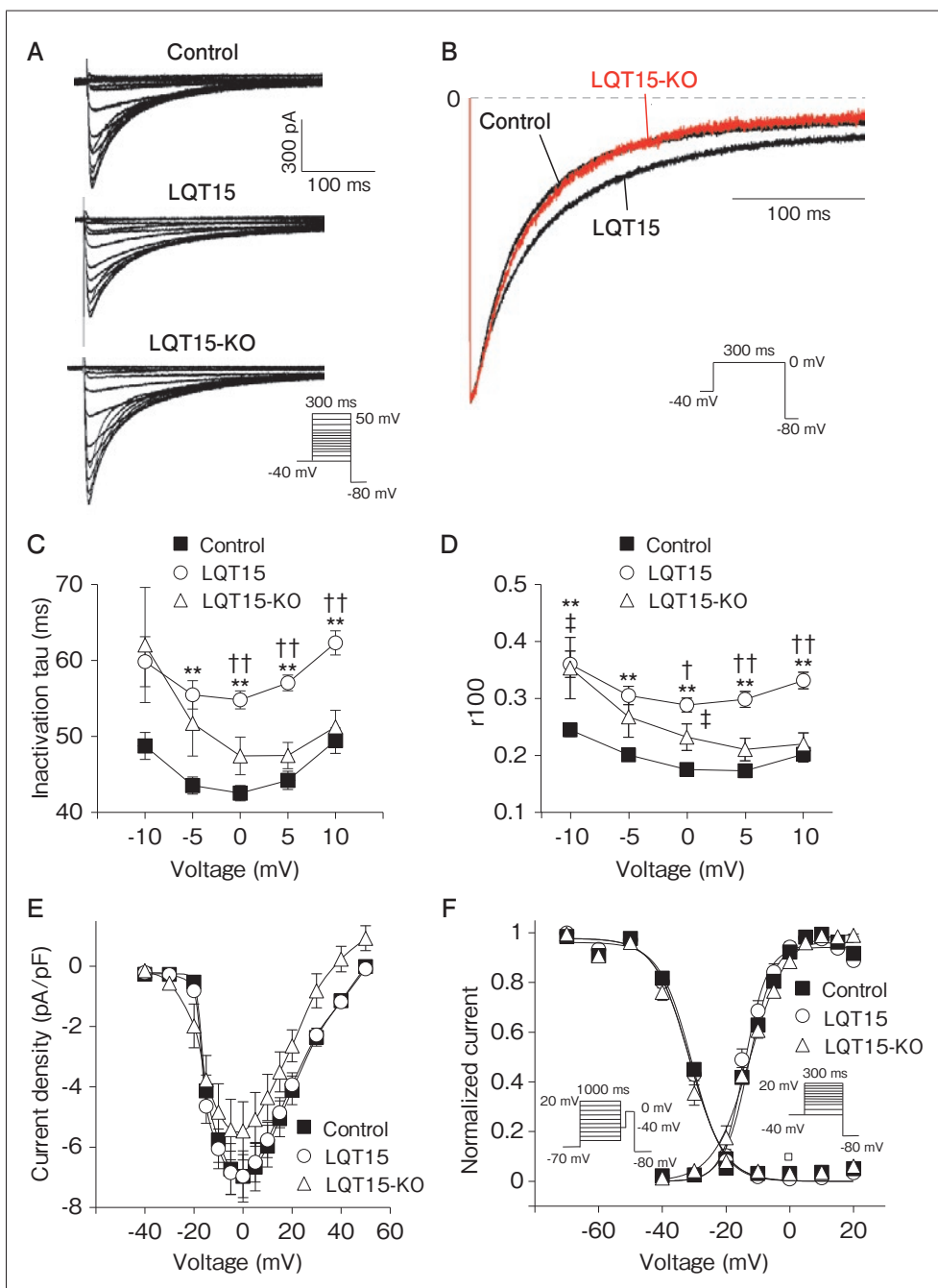


図6 分化心筋におけるL型Ca<sup>2+</sup>チャネル電流記録

- A: 各クローンにおけるL型Ca<sup>2+</sup>チャネル電流波形(I<sub>CaL</sub>)。
- B: 各L型Ca<sup>2+</sup>チャネル電流波形を標準化し、重ね合わせたもの。
- C: 不活性化の時定数τ (Control:n = 12, LQT15:n = 13, LQT15-KO:n = 7). \*\*p < 0.01 (Control vs. LQT15). ††p < 0.01 (LQT15 vs. LQT15-KO)。
- D: 100ミリ秒後における電流の残存率(r100). \*\*p < 0.01 (Control vs. LQT15). †p < 0.05, ††p < 0.01 (LQT15 vs. LQT15-KO). ‡p < 0.05 (LQT15 vs. Control)。
- E: 電流-電圧曲線。
- F: 活性化-不活性化曲線。

意図しないゲノム編集は認められなかった。また、quantitative real-time polymerase chain reaction (QPCR) による mRNA 定量を行ったところ、LQT15-KO では *CALM2* の発現がおよそ半分に減少しており、ゲノム編集により、*CALM2* の一方のアレルがノックアウトされていると考えられた (図 4A)。

### ③ LQT15-iPS 細胞由来分化心筋細胞の電気生理学的特徴と変異アレル特異的ノックアウトによる治療効果

樹立した iPS 細胞において、胚様体形成法による心筋分化誘導を行った<sup>11)</sup>。胚様体における拍動数はコントロールと比較して、LQT15 では有意に低下していたが、LQT-KO において改善が認められた (図 4B)。次に、パッチクランプ法を用いた活動電位の測定を行った。iPS 細胞由来分化心筋細胞における活動電位波形はさまざまであるが、本研究では記録された活動電位の形を解析し<sup>12)</sup>、心室筋タイプのみを解析対象とした (図 5A)。分化心筋の活動電位記録の結果、LQT15 においてコントロールと比較して有意な活動電位持続時間 (action potential duration: APD) の延長が認められた (図 5B)。また、変異アレル特異的ノックアウトにより、LQT15-KO 心筋細胞は APD 延長の有意な改善を認めた (図 5B)。また、APD は拍動数の影響を受けるため、拍動数で補正して比較を行ったが (corrected APD: cAPD)<sup>13)</sup>、結果は変わらず、LQT15 心筋において有意な cAPD 延長を認め、LQT15-KO においてレスキューされていた (図 5C)。

次に、膜電位固定法を用いて LTCC 記録を行ったところ、LQT15 において LTCC の不活性化障害が認められた (図 6A, B)。不活性化を評価する指標として、不活性化時定数  $\tau$  と電流のピークから 100 ミリ秒後の電流の残存率 (r100) を用いた。いずれの指標においても、コントロールと比較して LQT15 において有意に大きく、そのほかのチャンネルキネティクスに有意な違いは認められなかった (図 6C~F)。LQT15-KO においては LQT15 と比較

し、不活性化時定数  $\tau$  および r100 は有意に減少しており、APD 延長と同様に LTCC の不活性化障害に関しても改善が認められた。

## 2. 考察

本研究において、われわれは LQT15 患者より樹立した iPS 細胞を用いて、拍動数の減少や APD 延長など、患者の臨床症状 (徐脈、QT 間隔延長) と一致する LQT15-iPS 細胞モデルを確立することができた。また、本疾患モデルを用いて、ヒト心筋において LTCC の不活性化障害が LQT15 の発生機序の一つであること、ゲノム編集技術を用いた変異アレル特異的ノックアウトが表現型を改善することを明らかにした。

カルモジュリンには  $\text{Ca}^{2+}$  結合モチーフである EF ハンドが N、C 末端にそれぞれ 2 つずつ存在し、C 末端側の EF ハンドが N 末より  $\text{Ca}^{2+}$  結合能が高いことが知られている<sup>14)</sup>。興味深いことに、本研究で対象とした N98S 変異も含めて、これまで報告されている *CALM* 遺伝子変異の多くが C 末端の EF ハンドに存在しており、LQTS に関連した変異カルモジュリタンパクは野生型と比較して、 $\text{Ca}^{2+}$  親和性が低いことが報告されている<sup>4), 6)</sup>。カルモジュリンは、心筋細胞に発現する多くのイオンチャネルの機能調節において重要な役割を担っており、特に  $\text{Ca}^{2+}$  とカルモジュリンの複合体は LTCC の不活性化を促進することが知られている<sup>15)</sup>。このことから、 $\text{Ca}^{2+}$  親和性が低下した変異カルモジュリンは、LTCC の不活性化を障害することが予想される。本研究にて解析した N98S-変異カルモジュリンも、 $\text{Ca}^{2+}$  との親和性が低いことが報告されている<sup>3)</sup>。

カルモジュリンは RyR2 の機能制御においても重要な役割を担っており<sup>16), 17)</sup>、野生型カルモジュリンは RyR2 の開口確率を低下させる作用をもつ。CPVT 症例の大半が RyR2 変異による筋小胞体からの異常な  $\text{Ca}^{2+}$  リークであると考えられており、CPVT 関連カルモジュリン変異は RyR2 に作用していると考えられている。しかしながら、CPVT 症例で検出された変異カルモジュリンが RyR2 に親和性

が低いという報告<sup>3)</sup>がある一方で、逆に親和性が高いという報告<sup>17)</sup>もあり、その詳しい機序に関しては不明である。また、*CALM1* 遺伝子における N98S 変異においては CPVT 症例が報告されており<sup>3)</sup>、なぜ同じアミノ酸配列をもつタンパクの同じ変異にもかかわらず、*CALM1* と 2 で異なる表現型を示すかはまだわかっていない。

カルモジュリンは RyR2 以外にも Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup> チャンネルなど APD 延長に寄与するイオンチャンネルや、ペースメーカーチャンネル (*HCN4*)、CaMK II など心拍数にかかわる分子の機能に深く関係している。変異カルモジュリンが、これらの分子に与える作用についての研究が、さらなる疾患の発症機序解明と新たな治療法の開発に必要であると考えられる。

CRISPR-Cas9 システムは優れたゲノム編集技術であり、iPS 細胞を用いた研究領域においても遺伝子のノックアウトやノックイン、疾患モデルにおける遺伝子変異の修復などに広く用いられている。一方、本システムは意図しないゲノム編集を引き起こしてしまうオフターゲット効果があることが指摘されており<sup>18)</sup>、これを減少させるために、Cas9 の変異体であるニッカーゼを用いたダブルニッカーゼシステムが有効であるとの報告がなされている<sup>19)</sup>。本研究においても、ダブルニッカーゼシステムを用いてオフターゲット効果を抑えつつ、変異アレル特異的ノックアウトを行うことができた。また、変異アレル特異的ノックアウト手法は iPS 細胞モデルにおいて LQT15 の表現型を改善し、ほかのドミナントネガティブ効果を発症機序とする疾患にも応用できる可能性がある。ゲノム編集技術を用いた *in vivo* での遺伝子治療に関しては、すでにデュシェンヌ型筋ジストロフィー症のモデルマウスにおいて、アデノ随伴ウイルスベクターを用いたデリバリーにより効果的な結果が得られたとする報告がなされている<sup>20), 21)</sup>。心臓を含めた特定の臓器をターゲットとした遺伝子治療の臨床応用に向けて、さらなる安全性や効率の改善、優れたデリバリーツールの開発等が望まれる。

## 付記

本稿は、第 22 回日本不整脈心電学会学術奨励賞最優秀賞を受賞した論文をもとに、総説としてまとめたものである。なお、図 2~6 については、受賞論文より引用させていただいた。

## 受賞論文

Yamamoto Y, Makiyama T, Harita T, Sasaki K, Wuriyanghai Y, Hayano M, Nishiuchi S, Kohjitani H, Hirose S, Chen J, Yokoi F, Ishikawa T, Ohno S, Chonabayashi K, Motomura H, Yoshida Y, Horie M, Makita N, Kimura T : Allele-specific ablation rescues electrophysiological abnormalities in a human iPS cell model of long-QT syndrome with a CALM2 mutation. *Hum Mol Genet*, 2017 ; 26 : 1670~1677

## 【文 献】

- 1) Mizusawa Y, Horie M, Wilde AA : Genetic and clinical advances in congenital long QT syndrome. *Circ J*, 2014 ; 78 : 2827 ~ 2833
- 2) Shen X, Valencia CA, Szostak JW, Dong B, Liu R : Scanning the human proteome for calmodulin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005 ; 102 : 5969 ~ 5974
- 3) Nyegaard M, Overgaard MT, Søndergaard MT, Vranas M, Behr ER, Hildebrandt LL, Lund J, Hedley PL, Camm AJ, Wettrell G, Fosdal I, Christiansen M, Børglum AD : Mutations in calmodulin cause ventricular tachycardia and sudden cardiac death. *Am J Hum Genet*, 2012 ; 91 : 703 ~ 712
- 4) Crotti L, Johnson CN, Graf E, De Ferrari GM, Cuneo BF, Ovardia M, Papagiannis J, Feldkamp MD, Rathi SG, Kunic JD, Pedrazzini M, Wieland T, Lichtner P, Beckmann BM, Clark T, Shaffer C, Benson DW, Kääh S, Meitinger T, Strom TM, Chazin WJ, Schwartz PJ, George AL Jr : Calmodulin mutations associated with recurrent cardiac arrest in infants. *Circulation*, 2013 ; 127 : 1009 ~ 1017
- 5) Marsman RF, Barc J, Beekman L, Alders M, Dooijes D, van den Wijngaard A, Ratbi I, Sefiani A, Bhuiyan ZA, Wilde AA, Bezzina CR : A mutation in CALM1 encoding calmodulin in familial idiopathic ventricular



- fibrillation in childhood and adolescence. *J Am Coll Cardiol*, 2014 ; 63 : 259 ~ 266
- 6) Makita N, Yagihara N, Crotti L, Johnson CN, Beckmann BM, Roh MS, Shigemizu D, Lichtner P, Ishikawa T, Aiba T, Homfray T, Behr ER, Klug D, Denjoy I, Mastantuono E, Theisen D, Tsunoda T, Satake W, Toda T, Nakagawa H, Tsuji Y, Tsuchiya T, Yamamoto H, Miyamoto Y, Endo N, Kimura A, Ozaki K, Motomura H, Suda K, Tanaka T, Schwartz PJ, Meitinger T, Käåb S, Guicheney P, Shimizu W, Bhuiyan ZA, Watanabe H, Chazin WJ, George AL Jr : Novel calmodulin mutations associated with congenital arrhythmia susceptibility. *Circ Cardiovasc Genet*, 2014 ; 7 : 466 ~ 474
  - 7) Takahashi K, Ishikawa T, Makita N, Takefuta K, Nabeshima T, Nakayashiro M : A novel de novo calmodulin mutation in a 6-year-old boy who experienced an aborted cardiac arrest. *HeartRhythm Case Rep*, 2016 ; 3 : 69 ~ 72
  - 8) Fujita S, Nakagawa R, Futatani T, Igarashi N, Fuchigami T, Saito S, Ohno S, Horie M, Hatazaki K : Long QT syndrome with a de novo CALM2 mutation in a 4-year-old boy. *Pediatr Int*. 2019.
  - 9) Yamamoto Y, Makiyama T, Harita T, Sasaki K, Wuriyanghai Y, Hayano M, Nishiuchi S, Kohjitani H, Hirose S, Chen J, Yokoi F, Ishikawa T, Ohno S, Chonabayashi K, Motomura H, Yoshida Y, Horie M, Makita N, Kimura T : Allele-specific ablation rescues electrophysiological abnormalities in a human iPS cell model of long-QT syndrome with a CALM2 mutation. *Hum Mol Genet*. 2017 ; 26 : 1670 ~ 1677.
  - 10) Okita K, Yamakawa T, Matsumura Y, Sato Y, Amano N, Watanabe A, Goshima N, Yamanaka S : An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells*, 2013 ; 31 : 458 ~ 466
  - 11) Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, Roepke TK, Kattman SJ, Kennedy M, Henckaerts E, Bonham K, Abbott GW, Linden RM, Field LJ, Keller GM : Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature*, 2008 ; 453 : 524 ~ 528
  - 12) Matsa E, Rajamohan D, Dick E, Young L, Mellor I, Staniforth A, Denning C : Drug evaluation in cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells carrying a long QT syndrome type 2 mutation. *Eur Heart J*, 2011 ; 32 : 952 ~ 962
  - 13) Doss MX, Di Diego JM, Goodrow RJ, Wu Y, Cordeiro JM, Nesterenko VV, Barajas-Martínez H, Hu D, Urrutia J, Desai M, Treat JA, Sachinidis A, Antzelevitch C : Maximum diastolic potential of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes depends critically on I (Kr). *PLoS One*, 2012 ; 7 : e40288
  - 14) Peersen OB, Madsen TS, Falke JJ : Intermolecular tuning of calmodulin by target peptides and proteins : differential effects on Ca<sup>2+</sup> binding and implications for kinase activation. *Protein Sci*, 1997 ; 6 : 794 ~ 807
  - 15) Peterson BZ, DeMaria CD, Adelman JP, Yue DT : Calmodulin is the Ca<sup>2+</sup> sensor for Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron*, 1999 ; 22 : 549 ~ 558
  - 16) Bers DM : Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *J Mol Cell Cardiol*, 2004 ; 37 : 417 ~ 429
  - 17) Hwang HS, Nitu FR, Yang Y, Walweel K, Pereira L, Johnson CN, Faggioni M, Chazin WJ, Laver D, George AL Jr, Cornea RL, Bers DM, Knollmann BC : Divergent regulation of ryanodine receptor 2 calcium release channels by arrhythmogenic human calmodulin missense mutants. *Circ Res*, 2014 ; 114 : 1114 ~ 1124
  - 18) Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD : High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, 2013 ; 31 : 822 ~ 826
  - 19) Shen B, Zhang W, Zhang J, Zhou J, Wang J, Chen L, Wang L, Hodgkins A, Iyer V, Huang X, Skarnes WC : Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat Methods*, 2014 ; 11 : 399 ~ 402
  - 20) Nelson CE, Hakim CH, Ousterout DG, Thakore PI, Moreb EA, Castellanos Rivera RM, Madhavan S, Pan X, Ran FA, Yan WX, Asokan A, Zhang F, Duan D, Gersbach CA : In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*, 2016 ; 351 : 403 ~ 407
  - 21) Tabebordbar M, Zhu K, Cheng JKW, Chew WL, Widrick JJ, Yan WX, Maesner C, Wu EY, Xiao R, Ran FA, Cong L, Zhang F, Vandenberghe LH, Church GM, Wagers AJ : In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science*, 2016 ; 351 : 407 ~ 411

## Calmodulinopathy – Analysis of Human iPS Cell Model of Long-QT Syndrome with a *CALM2* Mutation and Therapeutic Approach Using Genome Editing Technology –

Yuta Yamamoto, Takeru Makiyama

Department of Cardiovascular Medicine, Kyoto University Hospital

Calmodulin is a ubiquitous  $\text{Ca}^{2+}$  sensor molecule encoded by the three unique genes, *CALM1*–3. Recently, mutations in *CALM1*–3 have been reported to be associated with severe arrhythmias including long-QT syndrome (LQTS). However, the underlying mechanism through which heterozygous calmodulin mutations lead to severe LQTS remains unknown, particularly in human cardiomyocytes. We aimed to establish an LQTS disease model associated with a *CALM2* mutation (LQT15) using human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) and to assess mutant allele-specific ablation by genome editing for the treatment of LQT15. We generated LQT15-hiPSCs from a 12-year-old boy with LQTS carrying a *CALM2*-N98S mutation and differentiated these hiPSCs into cardiomyocytes (LQT15-hiPSC-CMs). In addition, we performed mutant allele-specific knockout using a CRISPR-Cas9 system. Electrophysiological properties of hiPSC-CMs were analyzed by the patch-clamp technique. Electrophysiological analyses revealed that LQT15-hiPSC-CMs exhibited significantly lower beating rates, prolonged action potential durations (APD), and impaired inactivation of LTCC currents compared with control. Ablation of the mutant allele rescued the electrophysiological abnormalities of LQT15-hiPSC-CMs. These results indicate that the mutant allele caused dominant-negative suppression of LTCC inactivation, resulting in prolonged APD. We successfully recapitulated the disease phenotypes of LQT15 and revealed the pathophysiological mechanism in *CALM2*-N98S hiPSC model. Additionally, allele-specific ablation using the latest genome-editing technology provided important insights into a promising therapeutic approach for inherited cardiac diseases.

Keywords : Long-QT syndrome, iPS Cell, Calmodulin, Genome editing, Gene therapy