

は 100 例の非血縁者および我々の施設でのこれまでの検索で認められていない。

野生型である pIRES2-EGFP-KCNQ1 に KCNE1 を発現させると、 I_{Ks} に合致する電流が記録された。しかし変異型を単独で発現すると、K 電流は殆ど認められなかった。野生型と変異型を 1:1 で共発現させると、 I_{Ks} は 1/2 以下に減少し、Dominant Negative Suppression と解された。

変異による K チャネルおよびこれと野生型を共発現した場合のチャネルは細胞膜に認められた。このことから野生型にみられる電流の減少は膜への輸送の異常によるものではなかった。3 次元構造のモデルでは、313 に相当するアミノ酸は孔の中心部位に位置していること示した。

D. 考 察

本症の K チャネルの変異は、相隣り合う 2 つのコドンの同時変異により、アミノ酸がイソロイシン (中性荷電) からリジン (陽性荷電) に置換されるものであった。またコンピューターモデルから、変異部位は孔の中心に位置することが示された。

K チャネルの孔の中心は、イオンの選択性と透過性に強くかかわると考えられることから、その部位の変異によるアミノ酸の荷電の変化は本例でみられた K 電流の著明な減少をきたすと想定される。繰り返す失神も心室性不整脈によると考えられ、このような重症な病型は LQT1 において変異部位が膜ドメイン、特に孔部位にあることと関係していると思われる。LQT1 で変異部位と臨床像の関連は、本研究班班員による多施設研究からも明らかにされている。

このような K チャネルの Critical な部位におけるアミノ酸の荷電と分子サイズの変化は、K チャネルの機能を大きく変化させられると思われる。既に我々は陰性荷電を示すアミノ酸に置換する様な変異や、分子サイズを変えて孔のサイズを変化させることの K 電流への影響を検討している。

E. 結 論

失神を繰り返す LQT1 を 1 家族 3 例において、チャネルの孔部位に相当する 938 と 939 の重変異を認めた。

その結果当該アミノ酸の電荷は中性から陽性へ変化し、発現実験で loss of function がみられ、野生型との共発現では Dominant Negative Suppression(DNS)を示した。

変異チャネルも細胞膜に一致して認められ、チャネルの膜への輸送異常は否定された。

(参考文献)

1. Shimizu W et al. Mutation site-specific differences in arrhythmic risk and sensitivity to sympathetic stimulation in the LQT1 form of congenital long QT syndrome: Multicenter study in Japan. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:117-125

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ikrar T, Hanawa H, Watanabe H, Okada S, Aizawa Y, Ramadan MM, Komura S, Yamashita F, Chinushi M, Aizawa Y. A double-point mutation in the selectivity filter site of the KCNQ1 potassium channel results in a severe phenotype, LQT1, of long QT syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2008 (in press)

2. 学会発表

1. Ikrar T, Aizawa Y, et al. Novel mutation of KCNQ1 potassium channel at the potassium selectivity filter in a family with severe long QT syndrome. Cardiac Rhythm 2007. Hong Kong, China. Feb 2-4, 2007
2. Ikrara T, Aizawa Y, et al. Severe long QT phenotypes associated with novel mutation of I313K at the centre of KCNQ1 potassium channel pore. Venice Arrhythmias 2007. Venice, Italy. OCT 7-10, 2007

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

研究協力者

小村 悟

(新潟大学 循環器内科)

抗 KCNH2 (HERG) 抗体による自己免疫性 QT 延長症候群の病態の解明 － 後天性 QT 延長症候群の新しい発症機序の検討 －

分担研究者 大江 透 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 循環器内科 教授

研究要旨 後天性 QT 延長症候群は、生来健康であった者が薬剤・電解質異常・徐脈など後天的原因により、心電図上の QT 延長と致死性心室性不整脈を示す症候群である。明らかな原因が不明な場合、遺伝子診断を行うことにより、まず先天性の素因を検討することができる。我々は、遺伝子診断も含めて原因不明の後天性 QT 延長症候群患者において、抗 KCNH2 (HERG) チャネル抗体による自己免疫性の機序で発症する例があることを世界で初めて発見し報告した。その患者の抗 KCNH2 (HERG) 抗体は心筋の I_{Kr} 電流を慢性投与にて減弱させた。

A. 研究目的

後天性 QT 延長症候群は、生来健康であった者が薬剤・電解質異常・徐脈など後天的原因により、心電図上の QT 延長と致死性心室性不整脈を発症する症候群である。本研究の目的は明らかな原因が不明な症例において、自己免疫性の機序が後天性 QT 延長症候群を引き起こすかいなかを検討する事である。まず遺伝子診断にて先天性の要因を除外する。

B. 研究方法

1) PCR と sequence 法により、後天性 QT 延長症候群患者において遺伝子診断にて先天性の要因を検討する。

2) 培養細胞 (HEK 細胞) に発現させた KCNH2 電流 (I_{Kr} 電流) を、後天性 QT 延長症候群患者由来イムノグロブリン (IgG) にて減少できるか、パッチクランプ法にて検討する。

3) 患者 IgG の中に抗 KCNH2 (HERG) 抗体が含まれるか Western blotting 法にて検討する。

(倫理面への配慮)

岡山大学の倫理委員会に承認を得た上で患者様にインフォームド・コンセントを得て遺伝子診

断を行う。

C. 研究結果

1) QT 延長症候群患者において、KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNE2, KCNJ2 遺伝子に変異がなく、過去の心電図 (発症一年前) が正常で、先天性の要因を除外することができる症例があった。その症例は薬剤・徐脈・心不全・電解質異常もなく、従来言われているあきらかな後天的要因がなかった。

KCNE1 に D85N の polymorphism があり、QT 延長を助長させている可能性はあるが、発症一年前までの心電図が正常範囲であることより、この polymorphism が主たる原因ではないと考えられた。

2) パッチクランプ法にて検討したところ、培養細胞 (HEK293 細胞) に発現させた KCNH2 電流 (I_{Kr} 電流) は、その後天性 QT 延長症候群患者由来の血清または IgG の慢性投与にて濃度依存性に減少した。急性投与では減少しなかった。また、抗体除去後、再培養にて再び電流が復活した。

HEK293 細胞に KCNQ1/KCNE1 を発現させて得た I_{Ks} 電流は抑制しなかった。

抗体の慢性投与にてラット単離心筋の I_{Kr} 電流も減少させた。

3) その患者IgGの中に抗KCNH2 (HERG)抗体が含まれていることを、Western blotting 法にて確認できた。バンドの移動度より Mature formのKCNH2 蛋白に対する抗体であることがわかった。

D. 考 察

後天性 QT 延長症候群患者において、抗 KCNH2 (HERG)チャネル抗体を持つ症例があった。培養細胞 (HEK 細胞) に発現させた KCNH2 電流(I_{Kr} 電流)は、本抗体の慢性投与にて減少したが、急性投与では減少しなかったことより、抗体により、エンドサイトーシスの亢進などにより、KCNH2 (HERG)チャネルの発現が抑制されることが示唆された。 I_{Ks} 電流は抑制しなかったため、非特異的な反応ではなかった。ラット心筋における native I_{Kr} 電流も抑制するので、生体内で反応していることが十分考えられる。

後天性QT延長症候群の原因は種々報告されているが、自己のイオンチャネルへの抗体が原因で起こるQT延長症候群は新しい疾患概念である。遺伝子にて先天性の要因を除外することができたので、このような新規の原因が発見できた。今後、遺伝子診断の進歩にて、このように従来原因不明であった機序が解明されていくものと考えられる。

SSA/Ro 抗体陽性のシェーグレン症候群患者はQT間隔が軽度延長していることが知られている。本患者も SSA/Ro 抗体陽性であり、KCNH2 (HERG)チャネル抗体との関連も示唆される。

このような、症例には今後免疫抑制療法・抗体除去療法などの効果が期待される。

今後のさらなる病態解明、頻度などの調査も期待される。

E. 結 論

抗 KCNH2 (HERG)チャネル抗体による自己免疫性 QT 延長症候群を示す例があることを報告した。

F. 健康危険情報

特記なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakamura K, Katayama Y, Kusano FK, Haraoka K, Tani Y, Nagase S, Morita H, Miura D, Fujimoto Y, Furukawa T, Ueda K, Aizawa Y, Kimura A, Kurachi Y, **Ohe T**. Anti-KCNH2 antibody-induced long QT syndrome -Novel acquired form of LQT syndrome-. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(18):1808-1809.
2. 森田志保、**大江 透** QT延長症候群 *Pharma Medica*. 2007;25:59-62.

2. 学会発表

1. Nakamura K, Katayama Y, Haraoka K, Tani Y, Miura D, Morita H, Nagase S, Kusano KF, Furukawa T, Kimura A, Kurachi Y, **Ohe T**. Anti-KCNH2 Antibody-induced Long QT Syndrome -Novel Acquired Form of LQT Syndrome-. 米国心臓学会 (November 4-7, 2007.Orland, USA)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

研究協力者

中村一文、草野研吾

(岡山大学 循環器内科)

後天性 QT 延長症候群における新規原因遺伝子の探索と機能解析：
KCR1 E33D の役割

分担研究者 山岸正和 金沢大学大学院医学系研究科循環器内科 教授

研究要旨 最近、後天性 QT 延長症候群（aLQTS）の発症にイオンチャネルの遺伝子変異や多型が関与する報告が散見されるが、これまで報告された変異や多型を有する症例は少なく、その他の因子が aLQTS に関与している可能性がある。我々がラット小脳より同定した KCR1 蛋白は HERG チャネルと関与し、抗不整脈薬に対する HERG の薬物感受性を減弱させる。興味あることに、KCR1 のホモログである酵母小胞体に存在する糖付加転移酵素 ALG10 が KCR1 と同様に HERG チャネルの薬物遮断を阻害し、KCR1 が ALG10 と同様に糖付加転移酵素としての機能をもつ。KCR1 は細胞内糖鎖形成を増強させることによって HERG の薬剤感受性の調節を行うと考えられる。今回、日本人後天性 QT 延長症候群 40 名について KCR1 遺伝子の解析を行ったところ、遺伝子変異 KCR1 E33D を同定した。パッチクランプ法を用いて、KCR1 E33D の薬剤感受性評価を行い、KCR1 E33D は、ドフェチリドによる HERG 電流遮断を阻害しないことが示された。また、Yeast biochemical assay による KCR1 E33D の生化学的機能評価においては、KCR1 E33D は carboxypeptidase Y の成熟した glycosylated form を産生しないことが明らかとなった。以上より、KCR1 E33D 保因者では HERG チャネルの薬剤感受性の調節機構が破綻しており、この背景として糖付加転移酵素としての機能消失が関与することが推定される。その結果として aLQTS を生じさせる可能性があると考えられた。

A. 研究目的

後天性 QT 延長症候群（aLQTS）は薬剤、電解質代謝異常、徐脈、心筋虚血などの誘因とし、QT 延長や多型性心室頻拍を呈する疾患である。最近、aLQTS の発症にイオンチャネルの遺伝子変異や多型が関与する報告が散見されるが、これまで報告された変異や多型を有する症例は少なく、その他の因子が aLQTS に関与している可能性がある。我々はこれまでラット小脳において EAG K チャネルを活性化する KCR1 蛋白を同定してきた。さらに、KCR1 は HERG チャネルとも関与し、抗不整脈薬に対する HERG の薬物感受性を減弱させることを報告してきた。興味あることに、KCR1 のホモログである酵母小胞体に存在する糖

付加転移酵素 ALG10 が KCR1 と同様に HERG チャネルの薬物遮断を阻害し、KCR1 が ALG10 と同様に糖付加転移酵素としての機能をもつことを明らかにした。以上より KCR1 は細胞内糖鎖形成を増強させることによって HERG の薬剤感受性の調節を行うと考えた。今回、日本人後天性 QT 延長症候群 40 名について KCR1 遺伝子の解析を行い、同定された変異遺伝子の機能解析を行った。

B. 研究方法

対象は日本人後天性 QT 延長症候群 40 名（平均年齢 71 ± 16 歳）で KCR1, KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNE2 遺伝子について

PCR-SSCP法によるスクリーニングを行い、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した。同定された遺伝子変異については、Site directed mutagenesis法を用いて変異遺伝子発現ベクターを作成し、FuGENE6試薬 (Roche) を用いて、CHO-K1細胞に変異cDNAとEGFP cDNAをトランスフェクションさせた。その2日後に緑色の蛍光を発している細胞を光学顕微鏡(Axiovert 10, Carl Zeiss)を用いて選択し、パッチクランプ法にて細胞膜上に発現したチャネルに対して、様々な矩形波を与え、電気生理学的な特徴を検討した。また、さまざまな薬剤によるイオンチャネルの感受性についても検討した。データの収集および解析は、pCLAMP software (version8.0)とDigi DATA 1321 A/ D converter (Axon Instruments, Foster City, USA)を用いてパーソナルコンピュータ上で行った。さらに、Yeast biochemical assayを用いて変異KCR1の生化学的機能評価を行った。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒト遺伝子の解析を行うため、採血前に書面にて同意書をとって行った。不整脈関連心疾患の遺伝子解析については、金沢大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得た。また新規遺伝子の探索に際しては、予め倫理委員会の承認を得る。得られる個人情報については匿名化の上、厳重な管理の下に置き、情報漏れが生じないように最大限配慮した。解析の終了した検体のデータについては、パスワード管理され、インターネットに接続されていないパーソナルコンピュータで管理して、情報が漏洩しないよう個人情報の保護に細心の注意をはらって行った。

C. 研究結果

日本人後天性QT延長症候群40名の主な原因は薬剤および低カリウム血症であった。薬剤や低カリウム血症など外因性ストレス下でのQT時間は平均 545 ± 71 msecで9名にTorsade de pointesを7名に失神を認めた。

遺伝子解析の結果、遺伝子変異KCR1 E33Dを同定した。この変異はコントロール109名には認められなかった。また、3つのHERG遺伝子変異

を認めた。KCR1 E33Dが見いだされた症例は70歳男性で、母に突然死を認めた。高血圧、高脂血症で外来通院中に突然心肺停止状態となり、救急隊により心室細動が確認され直ちに電氣的除細動が施行された。入院時の採血で低カリウム血症($K\ 3.1$ mEq/l)を認めた。入院後の心電図でQTcの延長(QTc 502 ms)を認めたため、メトプロロールとメキシレチンの投与が開始され、QTcの正常化が認められた(QTc 363ms)。入院中に施行された冠動脈造影で左冠動脈に有意狭窄病変が認められた。

パッチクランプ法を用いて、KCR1 E33Dの電気生理学的特徴、薬剤感受性評価を行ったところ、KCR1 E33DはHERG電流の大きさを変化させず、また、HERGの活性化、不活性化を変化させなかった。KCR1 E33DによるHERGチャネルの薬剤感受性の調節を検討したところ、ドフェチリド50 nMを投与し、10秒ごとに100回脱分極パルスを与えた後のHERG+KCR1-WTの残存電流は投与前の電流の $74\pm 7\%$ ($n=7$)であったのに対し、HERG+KCR1-E33Dは $48\pm 6\%$ ($n=7$)と有意に小さく、HERG単独の $54\pm 5\%$ ($n=7$)と同等であった。また、HERG+KCR1-E33Dの IC_{50} は58 nMでHERG+KCR1-WTの189 nMと比べて有意に小であり、HERG単独の69 nMとほぼ同等であった。このようにKCR1-E33Dは、ドフェチリドによるHERG電流遮断を阻害しないことが示された。また、Yeast biochemical assayを用いてKCR1 E33Dの生化学的機能評価を行ったところ、KCR1 E33Dはcarboxypeptidase Yの成熟したglycosylated formを産生しないことが明らかになった。

D. 考察

パッチクランプ法を用いた薬剤感受性の検討で、KCR1 E33DではHERGチャネル阻害薬に対する防御作用が消失しており、生化学的検討で、KCR1 E33Dでは糖付加転移酵素機能が消失していた。活動電位シミュレーションを用いた以前の我々の検討では、HERGチャネル遮断により活動電位延長および早期後脱分極の出現が誘発されたが、これらはKCR1 WTの防御作用によって制限されていた。KCR1 E33Dの保因者では、本来存在するKCR1 WTによるHERGチャネルの薬剤

感受性の調節機構が破綻しており、その結果として aLQTS を生じさせる可能性があると考えられた。

最近、イオンチャネルの遺伝子変異や多型による無症候性のチャネル機能低下の存在下で、薬剤などの暴露によって活動電位が延長し、早期後脱分極が出現するという報告がなされている。KCR1 E33D の催不整脈作用のメカニズムは、これらの報告とは異なり、HERG 電流の低下をもたらさないが、薬剤に対する感受性を変化させることにより活動電位持続時間を延長させると考えられた。

E. 結論

KCR1 は aLQTS 発症に関与する新しい因子と考えられ、作用機序のさらなる解明により aLQTS の病態解明、治療につながる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawashiri MA, Nohara A, Tada H, Mori M, Tsuchida M, Katsuda S, Inazu A, Kobayashi J, Koizumi J, Mabuchi H, **Yamagishi M**. Comparison of Effects of Pitavastatin and Atorvastatin on Plasma Coenzyme Q10 in Heterozygous Familial Hypercholesterolemia: Results From a Crossover Study. *Clin Pharmacol Ther* 2007 Oct 24. (in press)
2. Kaneda T, Naruse C, Kawashima A, Fujino N, Oshima T, Namura M, Nunoda S, Mori S, Konno T, Ino H, **Yamagishi M**, Asano M. A novel beta-myosin heavy chain gene mutation, p.Met531Arg, identified in isolated left ventricular noncompaction in humans, resulted in left ventricular hypertrophy that progressed to dilation in a mouse model. *Clin Sci (Lond)* 114:431-440. 2007
3. Sakata K, Ino H, Fujino N, Nagata M, Uchiyama K, Hayashi K, Konno T, Inoue M, Kato H, Sakamoto Y, Tsubokawa T, **Yamagishi M**.

Exercise-induced systolic dysfunction in patients with non-obstructive hypertrophic cardiomyopathy and mutations in the cardiac troponin genes. *Heart* 2008. (in press)

4. Takeda Y, Zhu A, Yoneda T, Usukura M, Takata H, **Yamagishi M**. Effects of aldosterone and angiotensin II receptor blockade on cardiac angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme 2 expression in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 20(10):1119-24.2007
 5. Katsuda Y, Asano A, Murase Y, Chujo D, Yagi K, Kobayashi J, Mabuchi H, **Yamagishi M**. Association of genetic variation of the adiponectin gene with body fat distribution and carotid atherosclerosis in Japanese obese subjects. *J Atheroscler Thromb* 14(1):19-26. 2007
 6. Nohara A, Kawashiri MA, Claudel T, Mizuno M, Tsuchida M, Takata M, Katsuda S, Miwa K, Inazu A, Kuipers F, Kobayashi J, Koizumi J, **Yamagishi M**, Mabuchi H. High frequency of a retinoid X receptor gamma gene variant in familial combined hyperlipidemia that associates with atherogenic dyslipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(4):923-8.2007
 7. Konno T, Fujino N, Hayashi K, Uchiyama K, Masuta E, Katoh H, Sakamoto Y, Tsubokawa T, Ino H, **Yamagishi M**. Differences in the diagnostic value of various criteria of negative T waves for hypertrophic cardiomyopathy based on a molecular genetic diagnosis. *Clin Sci (Lond)* 112(11):577-82.2007
- ### 2. 学会発表
1. Hayashi K, **Yamagishi M**, et al. Prevalence of Long QT Syndrome and Frequencies of Gene Mutation Carriers in Japanese Children ACC, New Orleans, March 24-27, 2007
 2. Konno T, **Yamagishi M**, et al. Adverse Impact of Spontaneous Regression of Left Ventricular Hypertrophy on Heart Failure in Hypertrophic Cardiomyopathy: A Longitudinal Study in Carriers With a Lys183del Mutation in

the Cardiac Troponin I Gene. AHA, Orland, Nov. 4-7, 2007

3. Hayashi K, **Yamagishi M**, et al. A Novel Mutation In The *KCRI* Gene May Influence Susceptibility To The Acquired Long QT Syndrome AHA, Orland, Nov. 4-7, 2007
4. Sakamoto Y, **Yamagishi M**, et al. Mutations In The Nonpore Region of The HERG Gene Are at Risk of Acquired Long QT Syndrome AHA, Orland, Nov. 4-7, 2007
5. Fujino N, **Yamagishi M**, et al. Impact of Missense Mutations in the Cardiac Ryanodine Receptor Gene as a Cause of Hypertrophic Cardiomyopathy : A New Insight From Ca Handling. 日本循環器学会総会、福岡、3月28日-30日、2008年
6. Hayashi K, **Yamagishi M**, et al. Prevalence of Long QT Syndrome and Frequencies of Gene

Mutation Carriers in Japanese Children: an epidemiological and genetic study 日本循環器学会総会、福岡、3月28日-30日、2008年

7. Hayashi K, **Yamagishi M**, et al. Co-expression with trafficking-competent KvLQT1 selectively rescues HERG LQT2 mutations 日本循環器学会総会、福岡、3月28日-30日、2008年

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
研究協力者
林 研至
(金沢大学 循環器内科)

LQT3 と Brugada 症候群のオーバーラップ規定要因に関する多施設国際共同研究

分担研究者 蒔田直昌 北海道大学大学院医学研究科 循環病態内科学 講師

研究要旨 LQT3 と Brugada 症候群 (BrS) のオーバーラップの規定要因を明らかにするために、日米英伊独 7 施設で LQT3 を集積し、遺伝子解析と臨床像の解析を行った。E1784K は人種差を越えて最多の変異で、LQT3 と BrS を合併していた。チャンネルの電気生理学・薬理的機能解析から、LQT3 と BrS のオーバーラップを規定する要因は *SCN5A* チャンネルの機能異常であることが判明した。

A. 研究目的

LQT3 と Brugada 症候群 (BrS) のオーバーラップの規定要因を明らかにすること。

B. 研究方法

日米英伊独 7 施設で 44 家系の LQT3 を集積し、LQT3 と BrS の合併を含んだ臨床像を解析した。LQT3 家系の中で最も多い *SCN5A* 変異 E1784K について、チャンネル機能と薬理学的特性をパッチクランプで解析した。

(倫理面への配慮)

遺伝子診断は、日米英伊独 7 施設でそれぞれ倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

E1784K キャリア 41 人のうち 9 人 (24%) が、安静時または Ic 群薬投与後に BrS 様 ST 上昇を示した。E1784K の機能異常を LQT3 と BrS の合併変異・非合併変異と比較すると、LQT3 と BrS の合併に共通してみられる機能異常は、不活性化の膜電位依存性が過分極シフトと、Ic 群抗不整脈薬に対する感受性の亢進であった。

D. 考察

E1784K は人種を越えて最も頻度の高い LQT3 変異で、BrS を合併していた。LQT3 と BrS のオーバーラップを規定する要因は、人種・性・個人差などではなく、不活性化の過分極シフトという

SCN5A のチャンネル機能異常である。また、不活性化の過分極シフトを示すような *SCN5A* 変異のキャリアは BrS の合併が危惧されたため、Ic 群薬は避けるべきであると考えられた。

E. 結論

LQT3 と BrS のオーバーラップを規定する要因は *SCN5A* チャンネルの機能異常である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. **Makita N**, Sumitomo N, Watanabe I, Tsutsui H. Novel *SCN5A* mutation (Q55X) associated with age-dependent expression of Brugada syndrome presenting as neurally mediated syncope. *Heart Rhythm* 4, 516-519, 2007
2. **Makita N**, Tsutsui H. Genetic polymorphisms and arrhythmia susceptibility *Circ J* 71; A54-A60, 2007
3. Shan L, **Makita N**, et al Xing Y, Watanabe S, Futatani T, Ye F, Saito K, Ibuki K, Watanabe K, Hirano K, Uese K, Ichida F, Miyawaki T, Origasa H, Bowles NE, Towbin JA. *SCN5A* variants in Japanese patients with left ventricular noncompaction and arrhythmia. *Mol Genet Metabol* 93; 468-474, 2007

4. 蒔田直昌, 佐々木孝治, 筒井裕之. Brugada症候群の病因と発生機序. 心臓 39, 4-9, 2007
 5. 蒔田直昌 不整脈のハプロタイプ解析と人種差. 心電図 27, S3 3-14, 2007
 6. 蒔田直昌, 筒井裕之. 不整脈で見られる遺伝子異常. 臨床検査51, 691-696, 2007
 7. 蒔田直昌, 佐々木孝治, 清水 渉, 堀江 稔. 遺伝子多型と臨床薬理 致死性不整脈の遺伝子基盤に関するイオンチャネルのゲノム薬理学的研究 イオンチャネルの遺伝子多型と致死性不整脈. 臨床薬理の進歩 8-14, 2007
2. 学会発表
1. **Makita N** et al: Overlap Between LQT3 and Brugada Syndrome: Clinical Features in a Common Mutation and Underlying Biophysical Mechanisms. 80th American Heart Association, Orlando USA, Nov 2007
 2. **Makita N**. Overlap Between LQT3 and Brugada Syndrome: Clinical Features in a Common Mutation and Underlying Biophysical Mechanisms. XIII World Congress on Cardiac Pacing and Electrophysiology, Rome, Italy, Dec 2007
- 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

QT 延長症候群、Brugada 症候群の遺伝子解析

分担研究者 田中 敏博 理化学研究所 遺伝子多型研究センター

研究要旨 QT 延長症候群、Brugada 症候群の遺伝子解析を通じて、現時点で明らかになっていないこの疾患の病態解明の礎とする。候補遺伝子アプローチにて SNP 解析を行ったところ、複数の座位において、関連を示唆する結果が得られた。

A. 研究目的

QT 延長症候群、Brugada 症候群は心電図上 QT 時間の延長あるいは ST 部分の上昇を特徴とした疾患で、心室細動など血行動態を悪化させる心室性不整脈の生じる危険性が高くなり、失神発作さらには突然死の原因となる。家族性 QT 延長症候群については、これまで6つの原因遺伝子が単離されたが、そのうちの4つはカリウムチャンネルをコードしている遺伝子であり (KCNQ1, KCNH2, KCNE1, KCNE2), 1つはナトリウムチャンネル (SCN5A) をコードしていた。SCN5A は Brugada 症候群の原因遺伝子としても同定されている。ところが、これらの遺伝子に異常が同定されるのは患者全体の半分にも満たず、遺伝的要因の解明は不十分である。近年、DNA 多型、特に一塩基多型 (SNP) が疾患の病態に関与することが示唆されており、これらの疾患における SNP の役割を解明することが必要と考えられる。上記遺伝子あるいはその他の心臓イオンチャンネルもしくはチャンネルの機能を修飾する役割をもつ遺伝子の SNP を網羅的に解析することにより、不整脈疾患の分子遺伝学的背景を探る端緒とするのが目的である。

B. 研究方法

病態関与が考えられる候補遺伝子領域内に存在する SNP を対象として、ケースコントロールアソシエーション解析を行う。

(倫理面への配慮)

平成 18 年 12 月に理化学研究所倫理審査委員会にて研究計画の承認を受けた。

C. 研究結果

国立循環器病センターより QT 延長症候群患者 68 名、対照群 112 名についてのゲノム DNA 試料の供与を受け、それらを用いて解析した。17 種類のチャンネル遺伝子等、心臓にて発現の認められる遺伝子を選択し、その座位に存在する 62 SNP についてアソシエーション解析を行った。KCND3 遺伝子上の 2 SNP、KCNE1 遺伝子上の 1 SNP、KCNH2 遺伝子上の 1 SNP、SCN5A 遺伝子上の 1 SNP、SLC18A1 遺伝子上の 1 SNP が有意差を示唆するデータを示した。

D. 考 察

有意差を示唆するデータが合計 6 座位より得られた。ただし、大きな統計学的意味を持つかどうかは現時点でははっきりしない。それは、サンプル数の少なさに起因するものであり、サンプル数を拡大して検証を行う必要がある。

E. 結 論

候補遺伝子アプローチにて SNP 解析を行ったところ、複数の座位において、関連を示唆する結果が得られた。今後サンプル数を拡大して検証を行う必要がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mio F, Chiba K, Hirose Y, Kawaguchi Y, Mikami Y, Oya T, Mori M, Kamata M, Matsumoto M, Ozaki K, **Tanaka T**, Takahashi A, Kubo T, Kimura T, Toyama Y, Ikegawa S: A Functional Polymorphism in COL11A1, Which Encodes the alpha 1 Chain of Type XI Collagen, Is Associated with Susceptibility to Lumbar Disc Herniation. *Am J Hum Genet* 81(6):1271-1277, 2007.
 2. The International HapMap Consortium : Genome-wide detection and characterization of positive selection in human populations. *Nature* 449:913-918, 2007.
 3. The International HapMap Consortium : A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449(7164):851-861. 2007
 4. Miyamoto Y, Mabuchi A, Shi D, Kubo T, Takatori Y, Saito S, Fujioka M, Sudo A, Uchida A, Yamamoto S, Ozaki K, Takigawa M, **Tanaka T**, Nakamura Y, Jiang Q, Ikegawa S : A functional polymorphism in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis. *Nature Genetics* 39(4):529-553, 2007.
 5. Ebana Y, Ozaki K, Inoue K, Sato H, Iida A, Lwin H, Saito S, Mizuno H, Takahashi A, Nakamura T, Miyamoto Y, Ikegawa S, Odashiro K, Nobuyoshi M, Kamatani N, Hori M, Isobe M, Nakamura Y, **Tanaka T**: A functional SNP in ITIH3 is associated with susceptibility to myocardial infarction. *Journal of Human Genetics* 52:220-229, 2007
2. 学会発表
1. **Tanaka T** : Single-Nucleotide Polymorphisms Confer Risk of Myocardial infarction. American Heart Association scientific sessions, USA, November 3-7, 2007.
 2. Ozaki K, Sato H, Iida A, Mizuno H, Takahashi A, Nakamura T, Lwin H, Ikegawa S, Hori M, Nakamura Y, **Tanaka T** : 52,608 gene-based SNPs association study to identify genes related to myocardial infarction, USA, October 23-27, 2007.
 3. **Tanaka T** : SNP Analysis. The 11th Annual Scientific Meeting of the Japanese Heart Failure Society, Japan, September 9-10, 2007.
 4. **Tanaka T** : Biobank Japan. ISBER Annual Meeting & Exhibits, Singapore, May 30-June 2, 2007.
 5. **田中敏博**, 井上勝美, 中村祐輔, 尾崎浩一 : 心筋梗塞感受性分子ガレクチン-2と相互作用する分子の同定、解析. 日本人類遺伝学会、日本、9月12-15日、平成19年.
 6. 石井信明, 尾崎浩一, 佐藤洋, 水野裕八, 斎藤督, 高橋篤, 中村好宏, 池川志郎, 鎌谷直之, 斎藤頻, 堀正二, 中村祐輔, **田中敏博**: 大規模SNPケース・コントロール関連解析による心筋梗塞関連感受性新規RNA分子MIATの同定. 日本人類遺伝学会、日本、9月12-15日、平成19年.
 7. 江花有亮, 尾崎浩一, 井上勝美, 佐藤洋, 飯田有俊, 斎藤督, HTAYLWIN, 高橋篤, 中村好宏, 池川志郎, 鎌谷直之, 磯部光章, 堀正二, 中村祐輔, **田中敏博**: 大規模SNPケース・コントロール関連解析による心筋梗塞感受性分子ITIH3の同定. 日本人類遺伝学会、日本、9月12-15日、平成19年.
 8. 尾崎浩一, 佐藤洋, 飯田有俊, 水野裕八, 高橋篤, 中村好宏, 池川志郎, 鎌谷直之, 堀正二, 中村祐輔, **田中敏博**: ケース・コントロール関連解析による心筋梗塞感受性分子PSMA6の同定. 日本人類遺伝学会、日本、9月12-15日、平成19年.
 9. テイルイン, 尾崎浩一, 佐藤洋, 水野裕八, 池川志郎, 堀正二, 中村祐輔, **田中敏博**: 国際ハップマッププロジェクトからのtagSNPsを用いたホモシステイン関連遺伝子と心筋梗塞の関連解析. 日本人類遺伝学会、日本、9月12-15日、平成19年.
- 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

家族性不整脈疾患（特に心臓 Na チャネル病）の遺伝子解析・病態解明

分担研究者 赤尾昌治 京都大学大学院医学研究科循環器内科 助教

研究要旨 心臓 Na チャネルは SCN5A 遺伝子によりコードされ、その遺伝子異常により、QT 延長症候群 3 型、Brugada 症候群、心臓伝導障害、先天性洞不全症候群などの家族性不整脈を引き起こす。我々は、多施設より集められた家族性不整脈患者において SCN5A 遺伝子スクリーニングを行い、検出された変異に関してはパッチクランプを用いた電気生理学的機能解析を行ってきた。

特に Brugada 症候群は、右側胸部誘導における特徴的な ST 上昇と夜間の心室頻拍・心室細動を特徴とし、中年男性に突然死を来す。患者の約 15%に SCN5A 異常を認める。Brugada 症候群の病態には不明な点も多く、RNAi 発現アデノウイルスを用いた経冠動脈的心筋導入によるモデル動物構築の試みや、新規原因遺伝子の探索も進めている。

また、家族性心房細動は比較的稀であるが、我々は 3 世代に及ぶ家族性心房細動の 1 家系において SCN5A 変異を認め、機能解析では Na 電流量の増加を認めた。家族性心房細動においては初めての SCN5A 機能亢進の報告であり、心房細動の病態解明に新たな知見を与えると考える。

A. 研究目的

家族性不整脈疾患において遺伝子解析、機能解析を行い、疾患（特に Na チャネル病）の病態解明を目指す。また、基礎実験として Brugada 症候群のモデル動物を構築し、疾患の発生機序を解明する。

B. 研究方法

多施設より集まった家族性不整脈患者の末梢血リンパ球より DNA を抽出し、エクソン毎に PCR を行う。高速液体クロマトグラフィー（DHPLC）を用いてスクリーニングし、遺伝子変異を認める検体に関してはシーケンサーにて塩基配列を同定する。新規変異に関しては、変異チャネルを作製し、培養細胞に発現させ、パッチクランプ法を用いて電気生理学的機能解析を行う。また、Brugada 症候群のモデル動物構築に関しては、RNA 干渉(RNAi)を用いた Na チャネル抑制を行う。成人ラット心に RNAi 発現アデノウイルスを経冠動脈的に導入し心電図解析、単離

心筋の電流解析を行う。

（倫理面への配慮）

患者検体に関しては匿名化を行っており、京都大学医の倫理委員会にて承認済み。

C. 研究結果

家族性不整脈患者において網羅的に SCN5A 遺伝子解析を行い、先天性 QT 延長症候群 232 症例中、21 症例 (9.1%)、Brugada 症候群 105 症例中、13 症例 (11.4%)、家族性洞不全症候群 14 症例中、7 症例 (50%) において SCN5A 遺伝子異常を同定した。（全て発端者）

SCN5A 陽性 Brugada 症候群では、13 例中、5 例に徐脈性不整脈（4 症例は洞不全症候群、1 症例は完全房室ブロック）を合併し、機能解析では、全く Na 電流を認めない non-functional なチャネルであった。（Makiyama T, Akao M, et al. JACC 2005）

家族性洞不全症候群では、3 例に Brugada 症候群、1 例に QT 延長症候群の合併を認め、Na チャネル病

の表現型のoverlapを認めた。

また、3世代、有病者7例に及ぶ家族性心房細動家系において新規SCN5A遺伝子異常M1875Tを認めた。パッチクランプ法を用いた機能解析ではNaチャンネルの機能亢進を示した。

Brugada症候群のモデル動物構築に関して、ラット心へ低体温下に大動脈・肺動脈同時クランプ中、冠動脈よりRNAi発現アデノウイルス注入を行い、マーカーであるGFPの良好な導入効率を得た。この遺伝子導入後のラット心において、ランゲンドルフを用いてGFP陽性心筋の単離に成功し、現在、パッチクランプを用いた電流解析を行っている。

D. 考察

Brugada 症候群における SCN5A 遺伝子異常の頻度は、11.4% (13/105) であり、SCN5A 陽性 Brugada 患者では高率に徐脈性不整脈の合併 (5/13) を認めた。また、家族性洞不全症候群に関して、原因遺伝子の頻度は不明であったが、本研究で、SCN5A 異常が約半分に検出されることが分かった。

また、家族性心房細動家系において新規 SCN5A 遺伝子変異 M1875T を認めた。心房細動の原因として現在まで K チャンネルの遺伝子異常が報告されているが、Na チャンネルの機能亢進変異は初めてである。これらの所見は心房細動の病態解明に新たな知見を与えると考える。

RNAi を用いた Na チャンネル抑制によるモデル動物構築は全く新しい手法であり、他に類似研究はなく、新たな実験法の確立を目指すものである。

E. 結論

先天性 QT 延長症候群 9.1% (21/232)、Brugada 症候群 11.4% (13/105)、家族性洞不全症候群 50% (7/14) において SCN5A 遺伝子異常を同定した。また、家族性心房細動家系において新規 SCN5A 遺伝子異常 M1875T を認め、心房細動の原因遺伝子として初めての Na チャンネル機能亢進の報告となり、心房細動の病態解明に新たな知見を与えると考える。

Brugada 症候群のモデル動物構築に関しては、RNAi 発現アデノウイルスを用いたラット心への遺伝子導入、心筋単離にも成功し、現在電流解

析、心電図解析を進めている。

F. 健康危険情報
なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsuji K, **Akao M**, Ishii TM, Ohno S, Makiyama T, Takenaka K, Doi T, Haruna Y, Yoshida H, Nakashima T, Kita T, Horie M: Mechanistic basis for the pathogenesis of long QT syndrome associated with a common splicing mutation in KCNQ1 gene. *J Mol Cell Cardiol.* 2007 Mar;42(3):662-9.
2. Ohno S, Zankov DP, Yoshida H, Tsuji K, Makiyama T, Itoh H, **Akao M**, Hancox JC, Kita T, Horie M: N- and C-terminal KCNE1 mutations cause distinct phenotypes of long QT syndrome. *Heart Rhythm.* 2007 Mar;4(3):332-40.
3. Haruna Y, Kobori A, Makiyama T, Yoshida H, **Akao M**, Doi T, Tsuji K, Ono S, Nishio Y, Shimizu W, Inoue T, Murakami T, Tsuboi N, Yamanouchi H, Ushinohama H, Nakamura Y, Yoshinaga M, Horigome H, Aizawa Y, Kita T, Horie M: Genotype-phenotype correlations of KCNJ2 mutations in Japanese patients with Andersen-Tawil syndrome. *Hum Mutat.* 2007 Jan 12;28(2):208
4. **Akao M**, Takeda T, Kita T, Kume T, Akaike A: Serofendic Acid, a substance extracted from fetal calf serum, as a novel drug for cardioprotection. *Cardiovasc Drug Rev.* 2007;25(4):333-41.

2. 学会発表

1. Makiyama T **Akao M**, et al: Familial Dilated Cardiomyopathy with Conduction Disease Caused by a Lamin A/C Mutation: Efficacy of the Cardiac Resynchronization Therapy with a Defibrillator American Heart Association Scientific Sessions 2007, Orland, USA, 11.4-7, 2007

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

研究協力者

牧山 武 大野聖子 辻 啓子
(京都大学 循環器内科)

QT 延長症候群、Brugada 症候群の遺伝子解析に関する研究

分担研究者 宮本恵宏 国立循環器病センター臨床研究開発部 医長

研究要旨 致死性不整脈疾患について多くの原因遺伝子が明らかになってきている。先天性 QT 延長症候群は心電図所見で QT 間隔の延長を特徴とし、比較的若年者において運動中などに失神発作・突然死をきたす致死的不整脈疾患であり、現在までに 10 個の原因遺伝子が同定されている。臨床的に LQTS と診断された患者の中で遺伝子変異が同定される診断率は 50~60%と報告されている。当センターでは心電図・臨床的特徴から 1 次スクリーニングの対象遺伝子を決定し解析を行っている。今回我々は遺伝子型と表現型の関連性について検討を行い、遺伝子診断率について評価を行ったので報告する。

A. 研究目的

我々は遺伝子型と表現型の関連性について検討を行い、遺伝子診断率について評価を行ったので報告する。

B. 研究方法

LQTS 患者から EDTA 採血を行い、自動 DNA 抽出装置(NA-3000, KURABO 社)を用いて DNA 抽出を行った。ゲノム配列情報をもとに当該遺伝子をカバーする断片を PCR 法にて増幅し、Direct sequencing 法 (ABI Prism 3700 DNA Analyzer ;Applied Biosystems). を用いて変異の確認を行った。LQT1, LQT2, LQT3 それぞれに対し 1 次スクリーニングとして KCNQ1(16exon), KCNE2(15exon), SCN5A(28exon)遺伝子について塩基配列の決定を行った。さらに変異を同定できなかった患者に対しては別の対象遺伝子について 2 次スクリーニングを行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子検査は倫理委員会で承認後、文書にてインフォームドコンセントを取得しおこなった。

C. 研究結果

146 名の LQTS 患者は表現型から LQT1 は 80 名、LQT2 は 52 名、LQT3 は 14 名であった。そ

のうち 1 次スクリーニングでの遺伝子変異検出率は 146 名中、76 名 (52%) であった。変異を同定できなかった患者 70 名中、6 名 (9%) が 2 次スクリーニングで同定された。臨床的特徴から推定した遺伝子型による一次スクリーニングにより、原因遺伝子の検出率(PPV)は LQT1 40%, LQT2 65%, LQT3 71%、感度は LQT1 94%, LQT2 89%, LQT3 100%であった (下図)。2 次スクリーニングまでの遺伝子変異検出率は 82 名 (56%) であった。

臨床的特徴から分類した各グループにおける診断率

	PPV	NPV	Accuracy	Sensitivity*
LQT1 (n=80)	32/80 (40%)	64/66 (97%)	96/146 (66%)	32/34 (94%)
LQT2 (n=52)	34/52 (65%)	90/94 (96%)	124/146 (85%)	34/38 (89%)
LQT3 (n=14)	10/14 (71%)	132/132 (100%)	142/146 (97%)	10/10 (100%)
All LQTS (n=146)	76/146 (52%)	286/292 (98%)	362/438 (83%)	76/82 (93%)

PPV: positive predictive value

NPV: negative predictive value

* : 1 次スクリーニングの Sensitivity

D. 考察

臨床症状による表現型と遺伝子検査の一致率は高かった。しかし、1 次スクリーニングで陰性のものは 2 次スクリーニングでも陰性であることが多く検出率はあまり上がらない。未知の原因遺伝子を探索する必要があると考えられた。

E. 結 論

正確な臨床診断が行われることで、的確な対象遺伝子が決定され、高い遺伝子診断が迅速に行えると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shimasaki Y, Saito Y, Yoshimura M, Kamitani S, **Miyamoto Y**, Masuda I, Nakayama M, Mizuno Y, Ogawa H, Yasue H, Nakao K. The Effects of Long-term Smoking on Endothelial Nitric Oxide Synthase mRNA Expression in Human Platelets as Detected With Real-time Quantitative RT-PCR. *Clin Appl Thromb Hemost.* 13(1):43-51, 2007.
2. Ito A, Suganami T, **Miyamoto Y**, Yoshimasa Y, Takeya M, Kamei Y, Ogawa Y. Role of MAPK phosphatase-1 in the induction of monocyte chemoattractant protein-1 during the course of adipocyte hypertrophy. *J Biol Chem.* 282(35):25445-52, 2007.

3. Nishijima T, Nakayama M, Yoshimura M, Abe K, Yamamuro M, Suzuki S, Shono M, Sugiyama S, Saito Y, **Miyamoto Y**, Nakao K, Yasue H, Ogawa H. The endothelial nitric oxide synthase gene -786T/C polymorphism is a predictive factor for reattacks of coronary spasm. *Pharmacogenet Genomics.* 17(8):581-587, 2007.

2. 学会発表

1. 太田直孝、清水 渉、**宮本恵宏**、浦敏郎、新井浩司、佐藤 清、鎌倉史郎、吉政康直：臨床診断に基づく致死性不整脈の遺伝子診断。遺伝子診療学会、愛媛、平成19年7月27日（金）・28日（土）。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

研究協力者

太田直孝、浦 敏郎

(国立循環器病センター 遺伝子検査室)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Shimizu W, Ackerman MJ	Chapter 29, Provocative testing in inherited arrhythmias	Gussak I, AntzelevitchC, Wilde A, Friedman P, Ackerman MJ, Shen WK(eds)	Electrical Diseases of the Heart: Genetics, Mechanisms, Treatment, Prevention	Springer	UK	2007	424-433
Shimizu W	Chapter 50, Acquired form of Brugada syndrome	Gussak I, AntzelevitchC, Wilde A, Friedman P, Ackerman MJ, Shen WK(eds)	Electrical Diseases of the Heart: Genetics, Mechanisms, Treatment Prevention	Springer	UK	2007	719-728
Shimizu W, Antzelevitch C	Long QT syndrome	Lang F (ed)	Molecular mechanis ms of disease: an Encyclopedic reference	Springer	UK	2008 (in pres s)	
清水 渉, 相庭武司	13. Brugada症候群. 先天性QT延長症候 群とその類縁疾患	有田 眞, 犀川哲典, 小野克重	『QT間隔の診か た・考えかた』	医学書院	東京	2007	169-185
清水 渉	QT短縮症候群	杉本恒明監修, 井上 博編集	Medical Topics Series 不整脈 2007	メデイカ ルレビュ ー社	大阪	2007	158-164
清水 渉	遺伝学的検査と倫 理	井上 博, 山下武志	2. 不整脈診断に必 要な検査法を理解 しよう! I章 不整脈診療に必 要な知識 -必ずおさ えておきたい知識.	南江堂	東京	2008 (印刷中)	
清水 渉	QT延長症候群	井上 博, 山下武志	II章 臨床現場にお ける不整脈 -実践的 対処法	南江堂	東京	2008 (印刷中)	
伊藤英樹, 堀江 稔	致死性不整脈の遺 伝子診断	山口 徹, 高本眞一, 中澤 誠, 小室一成	Annual Review 循環器	中外医学 社	東京	2007	191-195
大江 透	不整脈-ベッドサイ ド診断から非薬物 治療まで-	大江透 (単著)	不整脈-ベッドサイ ド診断から非薬物 治療まで-	医学書院	東京	2007	全
今野哲雄, 井野秀一, 藤野 陽, 林 研至, 山岸正和	心不全 下 —最新の基礎・臨床 研究の進歩— XXIV. 心不全の原 因疾患 (基礎疾患) 別の臨床的事項 —病態、発症機序 (心不全)、治療— 心筋疾患 拘束型 心筋症		日本臨牀	日本臨牀 社	東京	2007	65(増刊 号5); 430-437

蒔田直昌	後天性QT延長症候群と遺伝子異常	監修 有田眞、 編集 犀川哲典、小野克重	QT間隔の診かた・考え方	医学書院	東京	2007	152-168
Ozaki K, Tanaka T	Genetic Backgrounds of Myocardial Infarction	Daniel Levy	Current Cardiovascular Risk Reports	Current Medicine Group	USA	2007	427-431