

先天性 QT 延長症候群の遺伝子変異例におけるチャネル機能の解析

分担研究者 相澤義房 新潟大学大学院医歯学総合研究科 循環器内科 教授

研究要旨 LQT1 は先天性 QT 延長症候群で最も頻度の高い疾患であり KCNQ1 の遺伝子変異による。これまで、K チャネル (IKs) の孔の中心部に位置するアミノ酸が、中性のイソロイシンから陰性荷電のアミノ酸リジンに変化した LQT1 変異を 1 家族 3 例に同定し、発現実験により電気生理学的に検討して報告した。COS7 における発現実験で変異遺伝子のみの発現では電流は殆ど認められず、野生型との共発現では Dominant Negative Suppression (DNS) を示した。今回、K チャネル (IKs) の孔の中心部に位置するアミノ酸の電荷と分子サイズを変えた時の K 電流への影響を検討した。アミノ酸をイソロイシンから陰性アミノ酸のリジン (I313K)、陽性荷電アミノ酸のグルタミン酸 (I313E)、最もサイズの小さいグリシン (I313G) および大きなバリン (I313V) へ変化する様な変異を作成し、単独および野生型と COS7 に発現させて電気生理学的に検討した。I313K および I313E では電流は殆ど認めず、野生型との共発現で DNS を示した。一方、I313G ではホモの発現では電流はわずかに減少したが、野生型との共発現ではむしろ電流は増大し、Gain of function を示した。I313V では単独および野生型との共発現で電流は野生型と差異を示さなかった。K チャネル (IKs) の孔の中心部に位置するアミノ酸の電荷は K 電流を減少させ、従って表現型や臨床像を大きく規定するが、中性のアミノ酸への置換をきたす様な変異では、K 電流への影響は少なく従ってその表現型も軽微と考えられた。KCNQ1 のフィルター部の変異では、アミノ酸の電荷やサイズにより表現型が規定されると考えられた。

A. 研究目的

先天性 QT 延長症候群でチャネル (IKs) の孔部のアミノ酸の置換をきたした遺伝子異常例の経験から、変異によるチャネル (IKs) の孔中心部に位置するアミノ酸の電荷とサイズの変えた時の K 電流への影響を発現実験検討した。

B. 研究方法

対象は失神と心電図異常を契機に新潟大学医歯学総合病院に紹介された 1 家系 3 例で、家系内に集積が認められ、その発現実験の成績は先に報告した。今回は孔中心のアミノ酸の電荷とサイズを変えた変異を作成し検討した。

発現実験：プラスミドベクターを作成し pIRES2-EGF-KCNQ1 (野生型) と、pIRES2-EGF-

I313K (変異型) として、KCNE1 とともに COS7 細胞に単独および混合して発現させた。I313K は孔中心のアミノ酸は中性から陰性のリジンに代わるものである。I313E は陽性荷電に I313G、I313V はそれぞれ中性荷電のアミノ酸のサイズを変えたものである。

電気生理学的検討は、COS7 でのパッチクランプ法により解析した (Axopatch 200B, Axon Instruments)。-80mV から +80mV までの範囲で 20mV 単位で脱分極パルスを与え、各電位に対する peak 電流 (密度) と tail 電流 (密度) を求めた。チャネルが細胞膜に輸送されているかは YFP または CFP を共発現させて検討した。

倫理面への配慮：当院は遺伝性不整脈疾患の診

断の対する高度先進医療の承認をうけている。検査に先立ち説明の後に同意書を得た。

C. 研究結果

単独発現の電気生理検査: I313K, I313E のいずれも単独発現では電流はほぼ認められなかった。I313G ではピーク電流は 20%減少した。I-V カーブは軽度左方に移動した。I313V では電流と I-V カーブは野生型と一致していた。

野生型との共発現では、I313K および I313E のいずれも DNS を示した。

I313G と野生型の共発現では、ピークおよび末尾電流はおおよそ 2 倍に増大した。また脱分極パルスを与えると、初期の電流の増加は大であったが、脱活性化も亢進し、I-V カーブも左方に移動していた。

I313V では野生型単独と電流に変化は認められなかった。

D. 考察

本症の K チャンネルの変異は、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は先に報告した。

K チャンネルの孔の中心は、イオンの選択性と透過性に強くかかわることから、その部位のアミノ酸の荷電の変化は K イオンの通過に大きく影響すると考えられ、これを陰性 (I313K) また陽性荷電 (I313E) のアミノ酸に置換した変異でも電流は消失または共発現で DNS を示した。

アミノ酸サイズでは、グリシンは単独発現時には K 電流は減少、野生型との共発現ではむしろ増大する所見を示した。これは I313G の単独発現時には孔サイズは小さくなるが、イソロイシンのヘテロマーを形成した時には、むしろ増大する可能性がある。活性化が初期に亢進しており、また I-V カーブの左方移動など、ゲート機構の変化もきたしていると考えられる。孔中心が中性アミノ酸のバリンにした時は、K 電流に影響はなかった。

E. 結論

- 1) 失神を繰り返す LQT1 を 1 家族 3 例において、チャン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陰性へ変化し (I313K)、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 を示した。
- 2) 当該アミノ酸の電荷を陽性へ変化 (I313E) させても I313K と同様の变化を示した。
- 3) 中性アミノ酸のままサイズを変えると、不変または K 電流増大を認めた。
- 4) 以上より、変異部位は極めて重要であるが、変異の結果どのようなアミノ酸に置換されるかも重要で、臨床像を規定していると思われる。

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.
2. 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;19(5):541-9.

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;19:541-549.

2. Watanabe H, Koopmann TT, Le Scouarnec S, Yang T, Ingram CR, Schott JJ, Demolombe S, Probst V, Anselme F, Escande D, Wiesfeld AC, Pfeufer A, Kääh S, Wichmann HE, Hasdemir C, Aizawa Y, Wilde AA, Roden DM, Bezzina CR. Sodium channel beta1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *J Clin Invest* 2008;118: 2260-2268.
 3. Chinushi M, Izumi D, Iijima K, Ahara S, Komura S, Furushima H, Hosaka Y, Aizawa Y. Antiarrhythmic vs. pro-arrhythmic effects depending on the intensity of adrenergic stimulation in a canine anthopleurin-A model of type-3 long QT syndrome. *Europace* 2008; 10:249-255.
 4. Ikrar T, Hanawa H, Watanabe H, Aizawa Y, Ramadan MM, Chinushi M, Horie M, Aizawa Y. Evaluation of channel function after alteration of amino acid residues at the pore center of KCNQ1 channel. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;378:589-594.
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 in 2007. Hong Kong, China. Feb 2-4, 2007
 2. Ikrar 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
 3. Ikrar T, Hanawa H, Furushima H, Hosaka Y, Iijima K, Aizawa Y. Functional Impact of Altered the Amino Acid Residue at the Selectivity Filter of KCNQ1 Potassium Channel: Insight into Gene Therapy For Severe Long QT Phenotype. First Asia pacific Heart Rhythm Society. 2008, Singapore.
- 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
新潟大学大学院医歯学総合研究科 循環器内科
保坂幸男

Brugada 症候群の心室細動発生予測指標としての Fragmented QRS 波形

分担研究者 草野研吾 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 循環器内科 准教授

研究要旨 Fragmented QRS 波形は、伝導障害のマーカーとして報告されているが、Brugada 症候群における意義については不明である。115 人の Brugada 症候群患者について調べたところ、平均 43 か月の観察期間で、58%の症例で心室細動 (VF) に起因する失神を認めた。またイヌ右室心外膜を用いた実験で、局所的な心外膜の伝導障害が fragmented QRS を作っており VF 発生への関与が示唆された。

A. 研究目的

Brugada 症候群における、fragmented QRS 波形の意義について検討した。

B. 研究方法

115 人の連続した Brugada 症候群患者の臨床背景と心電図波形の比較と、イヌ右室心外膜を用いた optical mapping で、心外膜の局所伝導障害が心電図波形におよぼす変化を検討した。

(倫理面への配慮)

岡山大学の倫理委員会を通過し、患者からの同意書を取得した。

C. 研究結果

平均43か月の観察期間でfragmented QRS波形を認めた患者の58%にVFに起因すると思われる失神が観察され、局所的な心外膜の伝導障害が fragmented QRSを作っておりVF発生への関与が示唆された。

D. 考察

すでに fragmented QRS 波形の意義については心筋梗塞で報告されているが、Brugada 症候群でも同様に予後指標として有用と考えられた。さらに従来報告されている遅延電位、VF 誘発性、SCN5A 遺伝子変異の有無よりも強力な VF 発生の規定因子と考えられた。

E. 結論 fragmented QRS 波形の存在は Brugada 症候群の VF 発生の予知に有用である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. **Kusano KF**. Brugada phenotype and prostate cancer. *Circ J* 2008;73:35-36.
2. **Kusano KF**, Taniyama M, Nakamura K, Miura D, Banba K, Nagase S, Morita H, Nishii N, Watanabe A, Tada T, Murakami M, Miyaji K, Hiramatsu S, Nakagawa K, Tanaka M, Miura A, Kimura H, Fuke S, Sumita W, Sakuragi S, Urakawa S, Iwasaki J, Ohe T. Atrial fibrillation in patients with Brugada syndrome: Relationship of gene mutation, electrophysiology and clinical backgrounds. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:1169-1175.
3. Nagase S, **Kusano KF**, Morita H, Nishii N, Banba K, Watanabe A, Hiramatsu S, Nakamura K, Sakuragi S, Ohe T. Longer repolarization in the epicardium at the right ventricular outflow tract causes type 1 electrocardiogram in patients with Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:1154-1161.

4. Tada T, **Kusano KF**, Nagase S, Banba K, Miura D, Nishii N, Watanabe A, Nakamura K, Morita H, Ohe T. Clinical significance of macroscopic T wave alternans after sodium channel blocker administration in patients with Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2008;19:56-61.
5. Morita H, **Kusano KF**, Miura D, Nagase S, Nakamura K, Morita ST, Ohe T, Zipes DP, Wu J. Fragmented QRS as a marker of conduction abnormality and a predictor of prognosis of Brugada syndrome. *Circulation* 2008,118: 1697-1704.
6. **草野研吾**. Brugada 症候群に対する薬物治療－内服治療や心室細動 storm 時の対応. *医学のあゆみ*. 2008;227:1059-1062.

2. 学会発表

1. Morita H. 日本循環器学会、福岡、3/28-30、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

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

研究協力者

岡山大学大学院医歯学総合研究科 循環器内科

森田 宏、中村一文

後天性 QT 延長症候群における Torsade de pointes 発症の予測因子に関する検討

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 後天性 QT 延長症候群 (aLQTS) において、Torsade de pointes (TdP) 発症を予測する心電図指標を評価し、TdP 発症に関与する因子を検討した。心電図指標の評価では、QTc, $T_{\text{peak-to-end}}$ および T_{pe} ($T_{\text{peak-to-end}}/\text{QT}$) が TdP 発症を予測する指標として有用と考えられた。aLQTS 発症に関与する因子の検討では、発症因子を有する数が多いほどより QT 延長、TdP 発症を来しやすいと考えられた。その中でも低 K 血症 ($K < 3.5 \text{ mEq/l}$) は独立した危険因子と考えられた。遺伝子解析の結果、TdP を発症した 4 患者において HERG 遺伝子変異および KCR1 遺伝子変異が認められた。機能解析の結果、それらの機能異常は極めて大きいものではないが、再分極予備能を十分低下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) において、高リスク患者を推定し、Torsades de pointes (TdP) の発生を予防することは極めて重要と考えられる。aLQTS において TdP 発症を予測する心電図指標を評価し、TdP 発症に関与する因子を検討した。

B. 研究方法

対象は薬剤等の原因により QT 延長 ($\geq 480\text{ms}$) および TdP あるいは VF を認めた 14 名 (TdP 群: 平均年齢 66 ± 20 歳)、QT 延長 ($\geq 480\text{ms}$) を認めたが、TdP および VF を認めなかった 17 名 (LQTS 群: 平均年齢 61 ± 14 歳)、QT 延長 ($\geq 480\text{ms}$) を認めず、TdP および VF も認めなかった 20 名 (Control 群: 平均年齢 60 ± 16 歳)。これらの症例に対して、心電図指標の評価、aLQTS 発症に関与する因子の検索、遺伝子解析、同定された遺伝子変異については、パッチクランプ法にて電気生理学的特徴を検討した。

(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。

C. 研究結果

心電図指標の評価ではベースラインの指標について 3 群間で有意差は認められなかったが、薬剤などのストレス存在下では、QTc, $T_{\text{peak-to-end}}$, T_{pe} ($T_{\text{peak-to-end}}/\text{QT}$) に関して 3 群間で有意差が認められた。薬剤などのストレス存在下の T_{pe} は TdP 群 0.36 ± 0.12 , LQTS 群 0.27 ± 0.09 , Control 群 0.21 ± 0.04 であり、TdP 群で有意に高値を示した。aLQTS 発症に関与する因子の検討では、電解質異常の有無に関して 3 群間で有意差が認められた。薬剤などのストレス存在下の血清 K 濃度は TdP 群 3.2 ± 0.8 , LQTS 群 3.8 ± 0.5 , Control 群 4.2 ± 0.2 であり、TdP 群で有意に低値を示した。遺伝子解析の結果、TdP 群において 3 種類の HERG 遺伝子変異 (M124T, R176fsX331, H492Y) と 1 種類の KCR1 遺伝子変異 E33D が認められた。一方、LQTS 群および Control 群では遺伝子変異は認められなかった。パッチクランプ法を用いて HERG 変異チャンネルの発現電流を評価したところ、+40mV の脱分極パルスを与えた後に -50mV で記録した M124T および R176fsX331 のそれぞれの最大末尾電流は、野生型と比較して有意に小であり、H492Y の電流値は、野生型のそれと比べて低い傾

向が認められた。いずれの変異チャネルも野生型チャネルに対して dominant-negative effect を示さなかった。KCR1 E33D の薬剤感受性評価を行ったところ、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。aLQTS 発症に関与する因子あるいは再分極予備能を調節する因子の総数を比較したところ、TdP 群 3.4 ± 0.8 、LQTS 群 2.5 ± 1.0 、Control 群 1.7 ± 0.9 であり、TdP 群は LQTS 群、Control 群に比し有意に高値を示した。また、LQTS 群の因子数は Control 群に比し有意に高値を示した。多重ロジスティック解析による危険因子の評価を行ったところ、低 K 血症 ($K < 3.5 \text{ mEq/l}$) がオッズ比 14.679、信頼区間 2.661-127.558 で、 p 値 < 0.01 を示した。

D. 考察

心電図指標の検討において、QT 延長、不整脈発生時の QTc、 $T_{\text{peak to end}}$ 、 T_{pe} は TdP group で有意に延長しており、これらは TdP を予測する指標になりうると思われた。

後天性 QT 延長症候群発症に関与する因子の検討において、発症因子の総数は Control 群に比べて LQTS 群が、LQTS 群に比べて TdP 群が有意に大であった。このことは、発症因子が重なることにより心筋再分極予備能が低下し、より QT 延長、TdP を引き起こしやすいと考えられる。その中でも低 K 血症が独立した危険因子と考えられた。遺伝子解析の結果、4 種類の遺伝子変異が TdP group で認められた。電気生理学的検討において、3 種類の HERG 遺伝子変異チャネルは野生型 HERG チャネルに対して Dominant negative 抑制を示さなかった。また、KCR1 遺伝子変異により、HERG チャネルの薬剤感受性の増強が認められた。これらの遺伝子変異による機能的変化は極めて大きなものではないが、再分極予備能を十分低下させる可能性があると考えられた。

E. 結論

後天性 QT 延長症候群における TdP 発症を予測

する指標として、QTc のみならず T_{pe} が有用である。再分極予備能を低下させる危険因子の蓄積により TdP が引き起こされると示唆される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Funada A, Hayashi K, Ino H, Fujino N, Uchiyama K, Sakata K, Masuta E, Sakamoto Y, Tsubokawa T, **Yamagishi M**. Assessment of QT intervals and prevalence of short QT syndrome in Japan. *Clin Cardiol*. 2008;31:270-274.
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 non-compaction in humans, results in left ventricular hypertrophy that progresses to dilation in a mouse model. *Clin Sci (Lond)* 2008;114: 431-440.
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;94: 1282-1287.
4. Uchiyama K, Hayashi K, Fujino N, Konno T, Sakamoto Y, Sakata K, Kawashiri MA, Ino H, **Yamagishi M**. Impact of QT variables on clinical outcome of genotyped hypertrophic. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2009;14:65-71.
5. 林 研至, 坂元裕一郎, 藤野 陽, 井野秀一, 山岸正和. QT 延長症候群における遺伝子診断. 循環器科 2008;63:561-567.
6. 林 研至, 坂元裕一郎, 井野秀一, 山岸正和. 遺伝子診断を踏まえた QT 延長・Brugada 症候群の治療. *Heart View* 2008;12:117-123.

2. 学会発表

1. Hayashi K, **Yamagishi M**, et.al. Impact of combined risk factors on reduction of cardiac repolarization reserve associated with drug-induced abnormal QT prolongation and torsade de pointes 日本循環器学会総会, 大阪, 2008年3月20-22日

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

金沢大学大学院医学系研究科 循環器内科

林 研至

先天性洞不全症候群の新規原因遺伝子

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 准教授

研究要旨 先天性洞不全症候群 (SSS) の遺伝子解析によって *KCNQ1* 変異 V141M を同定した。V141M はすでに QT 短縮症候群として報告された変異であるが、3 人の家系内キャリアの心電図はいずれも SSS で、QT 異常は認めなかった。パッチクランプとコンピュータシミュレーションから、V141M は遅延整流 K 電流 (IKs) の活性化を亢進し脱活性化を遅延させ、そのため洞結節活動電位が減弱し、SSS の原因となっていることが判明した。*KCNQ1* は先天性 SSS の新規原因遺伝子である。

A. 研究目的

先天性 SSS の原因遺伝子として、心筋 Na チャネル *SCN5A* とペースメーカーチャネル *HCN4* が報告されているが、これらの遺伝子に変異が見つからない家系もある。本研究の目的は先天性 SSS の新たな原因遺伝子を発見することである。

B. 研究方法

先天性 SSS 11 家系の発端者と家族の末梢血ゲノム DNA を用いて、PCR・直接シーケンス法で QT 延長症候群関連遺伝子の変異検索を行った。また変異チャネルを培養細胞に発現させ、パッチクランプ法で機能解析を行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子検査は北海道大学医学部医の倫理委員会の了承を受けている。

C. 研究結果

SSS 11 家系中に *SCN5A* 変異を 3 つと *KCNQ1* 変異 V141M を認めた。*KCNQ1*-V141M のキャリアの心電図はいずれも SSS のみで QT 短縮や延長を認めなかった。パッチクランプで V141M の機能を正常 *KCNQ1* と比較すると、電流密度は同等だが、活性化の亢進と脱活性化の著明な遅延という機能的な gain-of-function が確認された。改変 Kyoto model を用いたコンピュータシミュレーションで、*KCNQ1*

の gain-of-function が洞結節の活動電位の振幅と脈拍数を低下させることが判明した。

D. 考察

これまで先天性 SSS の原因遺伝子として知られているのは *SCN5A* とペースメーカーチャネル *HCN4* のみである。*KCNQ1* 変異 V141M は QT 短縮として報告のある変異だが、キャリア全員が心電図上 QT に異常のない SSS であり、この変異が洞結節の機能を低下させることがパッチクランプとコンピュータシミュレーションで確認された。*KCNQ1* は SSS の新たな原因遺伝子であると考えられた。

E. 結論

先天性 SSS の新規原因遺伝子として *KCNQ1* を同定した。

F. 健康危険情報 なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shan L, **Makita N**, Xing Y, Watanabe S, Futatani T, Ye F, Saito K, Ibuki K, Watanabe K, Hirono 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 Metab 2008;93:468-474.

2. **Makita N**, Behr E, Shimizu W, Horie M, Sunami A, Crotti L, Schulze-Bahr E, Fukuhara S, Mochizuki N, Makiyama T, Itoh H, Christiansen M, McKeown P, Miyamoto K, Kamakura S, Tsutsui H, Schwartz PJ, George AL Jr, Roden DM. The E1784K mutation in *SCN5A* is associated with mixed phenotype of type 3 long QT syndrome. *J Clin Invest* 2008;118:2219-2229.
3. **Makita N**, Mochizuki N, Tsutsui H. Absence of a trafficking defect in R1232W/T1620M, a double *SCN5A* mutant responsible for Brugada syndrome. *Circ J* 2008;72:1018-1019.
4. Otagiri T, Kijima K, Osawa M, Ishii K, **Makita N**, Matoba R, Hayasaka K. Cardiac ionc channel gene mutations in sudden infant death syndrome. *Pediatric Res* 2008;64:482-487.
5. Tsurugi T, Nagatomo T, Abe H, Oginosawa Y, Takemasa H, Kohno R, **Makita N**, Makielski JC, Ttsuji Y. Differential modulation of late sodium current by protein kinase A in R1623Q mutant of LQT3. *Life Sci* 2009 (in press)
6. 蒔田直昌. 心筋イオンチャネル病. *Medical Practice* 2008;25:1021-1022.
7. 蒔田直昌. Brugada 症候群の遺伝子変異. *Heart View* 2008;12:1098-1105.
8. 蒔田直昌. QT 延長症候群と遺伝子異常と臨床. *心臓* 2008;40:1060-1065.
9. 蒔田直昌. Brugada 症候群の分子生物学的。薬理学的機序と遺伝子診断. *医学のあゆみ* 2008;227:1023-1028.

2. 学会発表

1. **Makita N**. Overlap Between LQT3 and Brugada Syndrome: Individual specific or Mutation specific? 16th World Congress in Cardiac Electrophysiology and Cardiac Tequiques, and Cardiotim, Nice, France, 2008

年 6 月 18 日

2. **Makita N**, Shimizu W, Horie M, et al. Overlap Between LQT3 and Brugada Syndrome: Clinical Features in a Common Mutation and Underlying Biophysical Mechanisms. 80th American Heart Association, Nov 2007, Orlando USA.
3. **Makita N** et al, Familial isolated cardiac conduction defect associated with a germ-line mutation in the connexin40 gene *GJA5* 81st American Heart Association, Nov 2008, New Orleans USA.
4. **Makita N**, Shimizu W, Horie M, et al. Overlap between LQT3 and Brugada syndrome: Clinical features in a common mutation and underlying biophysical mechanisms. プレナリーセッション. 第 72 回日本循環器学会総会 (福岡) 2008 年 3 月 28 日

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

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 ゲノム医科学研究センター

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 12 つの原因遺伝子が単離されたが、その中で 4 つはカリウムチャ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ネルもしくはチャ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。合計 19 種類のチャネル遺伝子等、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 90 SNP についてアソシエーション解析を行った。KCNB1 遺伝子上の 1 SNP、KCND3 遺伝子上の 2 SNP、KCNE1 遺伝子上の 1 SNP、KCNH2 遺伝子上の 1 SNP、KCNQ1 遺伝子上の 1 SNP、SCN5A 遺伝子上の 1 SNP、SLC18A1 遺伝子上の 3 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 10 座位より得られた。ただし、確かな統計学的意味を持つかどうかは現時点では明確ではない。サンプル数の少なさがこの不明確さの原因であり、サンプル数を拡大して検証を行わなければ結論は出せない。

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が、確定的ではない。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. Miyamoto Y, Shi D, Nakajima M, Ozaki K, Sudo A, Kotani A, Uchida A, **Tanaka T**, Fukui N, Tsunoda T, Takahashi A, Nakamura Y, Jiang Q, Ikegawa S: Common variants in *DVWA* on chromosome 3p24.3 are associated with susceptibility to knee osteoarthritis. *Nature Genetics* 2008;40:994-998.
2. Hirose Y, Chiba K, Karasugi T, Nakajima M, Kawaguchi Y, Mikami Y, Furuichi T, Mio F, Miyake A, Miyamoto T, Ozaki K, Takahashi A, Mizuta H, Kubo T, Kimura T, **Tanaka T**, Toyama Y, Ikegawa S: A functional polymorphism in *THBS2* that affects alternative splicing and MMP binding is associated with lumbar-disc herniation. *American Journal of Human Genetics* 2008;82:1122-1129.
3. Mototani H, Iida A, Nakajima M, Furuichi T, Miyamoto Y, Tsunoda T, Sudo A, Kotani A, Uchida A, Ozaki K, Tanaka Y, Nakamura Y, **Tanaka T**, Notoya K, Ikegawa S: A functional SNP in *EDG2* increases susceptibility to knee osteoarthritis in Japanese. *Human Molecular Genetics* 2008;17:1790-1797.
4. Suna S, Sakata Y, Shimizu M, Nakatani D, Usami M, Matsumoto S, Mizuno H, Ozaki K, Takashima S, Takeda H, **Tanaka T**, Hori M, Sato H: Lymphotoxin- $\alpha 3$ mediates monocyte-endothelial interaction by TNFR I/NF- κ B signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009;379:374-378.
5. Ozaki K, Sato H, Inoue K, Tsunoda T, Sakata Y, Mizuno H, Lin T-H, Miyamoto Y, Aoki A, Onouchi Y, Sheu S-H, Ikegawa S, Odashiro K, Nobuyoshi M, Juo S-H H, Hori M, Nakamura Y, **Tanaka T**: SNPs in BRAP associated with risk of myocardial infarction in Asian populations. *Nature Genetics* 2009 (in press)
6. **田中敏博**: SNP とハプロタイプ地図. 成人病と生活習慣病 2008;38:1123-1126.
7. 尾崎浩一、**田中敏博**: 虚血性心疾患と関連遺

伝子. 循環器科 2008;63:517-522.

8. 尾崎浩一、**田中敏博**: 心筋梗塞のゲノムワイド関連解析. 医学のあゆみ 2008;225:781-786.
 9. 角田達彦、**田中敏博**, 中村祐輔: 国際 HapMap プロジェクト. 実験医学増刊号 2008;26:32(998)-87(1002).
2. 学会発表
1. Kato M, Miya F, Kanemura Y, **Tanaka T**, Nakamura Y, Tsunoda T: Patterns of high-resolution recombination rates in human genes. Human Genome Meeting, India, September 27-30, 2008
 2. **Tanaka T**: Genetic background of myocardial infarction. Mendel Symposium II Genes and the Heart, Czech Republic, September 24-27, 2008
 3. Ozaki K, Sato H, Ishii N, Ebana Y, Iida A, Mizuno H, Hori M, Nakamura Y, and **Tanaka T**: Large scale SNPs association study to identify genes confer risk of myocardial infarction. 14th World Congress on Heart Disease, USA, July 26-29, 2008
 4. **Tanaka T**: Genetic backgrounds of myocardial infarction. The 2008 EAUHGS Symposium and the 8th EAUHGS Annual Meeting, Japan, July 19, 2008
 5. 加藤護、宮冬樹、金村米博、**田中敏博**、中村祐輔、角田達彦: Patterns of high-resolution recombination rates in human genes. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会、12月9-12日、2008
 6. 尾崎浩一、佐藤洋、角田達彦、坂田泰彦、堀正二、中村祐輔、**田中敏博**: リンホトキシン- α によって冠動脈血管内皮細胞から誘導される分子の同定、解析. 日本人類遺伝学会第53回大会、日本、9月27-30日、2008
 7. 加藤護、宮冬樹、金村米博、**田中敏博**、中村祐輔、角田達彦: ヒト遺伝子における高精度組み換え率のパターン. 日本人類遺伝学会第53回大会、日本、9月27-30日、2008
 8. 青木亜佐子、尾崎浩一、高橋篤、齋藤督、久保充明、角田達彦、安武正弘、鎌谷直之、中村祐輔、**田中敏博**: 不安定狭心症の25万 SNP

を用いた全ゲノム関連解析. 日本人類遺伝学
会第 53 回大会、日本、9 月 27-30 日、2008

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

理化学研究所 ゲノム医科学研究センター

尾崎浩一

家族性心房細動の新たな発症基盤の解明

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 心房細動は、高齢者に多い「common disease」であり、血栓症や心不全などにより、患者の Quality-of-life や予後に大きく影響する。今回、7例の有病者を認める家族性心房細動の一家系にて、心臓 Na チャネル遺伝子（SCN5A）異常、M1875T、を検出した。変異 Na チャネルを培養細胞に発現させ、ホールセル・パッチクランプ法を用いた電気生理学的機能解析を行ったところ、不活化の遅延、内向き Na 電流量の増加を認め、機能亢進の所見を認めた。現在まで、家族性心房細動の原因遺伝子として主に K チャネルが報告されていたが、本研究は、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られる。

A. 研究目的

家族性心房細動の家系において原因遺伝子の探索、またその遺伝子異常の機能解析を行い、疾患の発生機序を解明する。

B. 研究方法

患者の末梢血リンパ球より DNA を抽出し、イオンチャネルなどの候補遺伝子に関して、高速液体クロマトグラフィー（DHPLC）を用いた網羅的スクリーニングを行った。検出された遺伝子変異に関しては、変異チャネルを作製し、培養細胞（HEK293 細胞）に発現させ、ホールセル・パッチクランプ法を用いた電気生理学的機能解析を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は、京都大学医の倫理委員会にて承認済みである。

C. 研究結果

7例の若年発症の心房細動・頻拍が集積した家系において遺伝子解析を行い、臨床像の検討、変異チャネルの機能解析を行った。発端者は、18才時より、上室性期外収縮の頻発、27才時には心房細動を認め、カテーテルアブレーション施行。手技

中、右房全体の自動能亢進、易刺激性を認めた。遺伝子解析にて、心臓Naチャネル遺伝子（SCN5A）異常、M1875T、を全有病者に検出した。変異Naチャネルを培養細胞に発現させ、ホールセル・パッチクランプ法を用いた電気生理学的機能解析を行ったところ、不活化の遅延、内向きNa電流量の増加を認めた。また、活性化曲線のシフトは見られなかったが、不活化曲線では16.4mVという大きな脱分極側へのシフトを認めた。いずれもNaチャネルの機能亢進の所見を示唆する結果であった。

D. 考察

心房細動の原因として現在まで K チャネルの遺伝子異常が報告されているが、機能亢進 Na チャネル変異は初めてである。Na チャネルの機能亢進でなぜ心筋の興奮性が上がるのか、また、SCN5A は心房心室とも発現しているが、本症例は、心房のみの表現型であり、不明な点も多い。computer simulation や transgenic mice を用いたさらなる解析を現在進めている。

E. 結論

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。心房細動の原因遺伝子として初めての Na チャ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。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Makiyama T, **Akao M**, Shizuta S, Doi T, Nishiyama K, Oka Y, Ohno S, Nishio Y, Tsuji K, Itoh H, Kimura T, Kita T, Horie M. A novel *SCN5A* gain-of-function mutation M1875T associated with familial atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:1327-1334.
2. Makiyama T, **Akao M**, Haruna Y, Tsuji K, Doi T, Ohno S, Nishio Y, Kita T, Horie M. Mutation analysis of the glycerol-3 phosphate dehydrogenase-1 like (GPD1L) gene in Japanese patients with Brugada syndrome. *Circ J*. 2008;72:1705-1706.
3. 牧山武, **赤尾昌治**. Brugada 症候群とその類縁疾患 (進行性伝導欠損 (PCCD)、家族性洞不全症候群、など) の基礎、診断、治療. *心臓* 2008;40:1066-1073.

2. 学会発表

1. Makiyama T, **Akao M**, et al. A novel *SCN5A* gain-of-function mutation M1875T associated with familial atrial fibrillation. American Heart Association Scientific Sessions 2008, New Orleans, USA, 11.9-12, 2008
2. Makiyama T, **Akao M**, et al. *SCN5A* and *Lamin A/C* gene mutations are highly prevalent in patients with familial bradyarrhythmic disorders. American Heart Association Scientific Sessions 2008, New Orleans, USA, 11.9-12, 2008
3. Tsuji T, **Akao M**, et al. Identification and functional characterization of a novel intronic splicing mutation in *KCNQ1* associated with long QT syndrome. American Heart Association Scientific Sessions 2008, New Orleans, USA, 11.9-12, 2008

4. 牧山 武, **赤尾昌治**, 他: A novel *SCN5A* gain-of-function mutation M1875T associated with familial atrial fibrillation., 第 25 回日本心電学会学術集会奨励賞最優秀賞, 新潟, 11.1-2, 2008
5. 牧山 武, **赤尾昌治**, 他: Brugada Syndrome and Diverse Phenotypes of Cardiac Sodium Channelopathies. 第 72 回日本循環器学会学術集会 (プレナリーシンポジウム), 福岡, 3.28-30, 2008.
6. 牧山 武, **赤尾昌治**, 他: A novel *SCN5A* gain-of-function mutation M1875T associated with familial atrial fibrillation. 第 72 回日本循環器学会学術集会, 福岡, 3.28-30, 2008.
7. 牧山 武, **赤尾昌治**, 他: Cardiac sodium channel gene mutations are prevalent in Japanese patients with familial sick sinus syndrome. 第 72 回日本循環器学会学術集会, 福岡, 3.28-30, 2008.
8. 牧山 武, **赤尾昌治**, 他: Familial Dilated Cardiomyopathy with Conduction Disease Caused by Lamin A/C Mutations: Efficacy of the Cardiac Resynchronization Therapy with a Defibrillator. 第 72 回日本循環器学会学術集会, 福岡, 3.28-30, 2008.
9. 牧山 武, **赤尾昌治**, 他: Mutation Analysis of the Glycerol-3 Phosphate Dehydrogenase-1 Like (GPD1L) Gene in Japanese Patients with Brugada Syndrome. 第 72 回日本循環器学会学術集会, 福岡, 3.28-30, 2008.

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

京都大学大学院医学研究科 循環器内科

牧山 武

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 12 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。平成 18 年度からの 3 年間で行った遺伝子検査の診断率と変異の種類について報告する。

A. 研究目的

我々は QT 延長症候群(LQTS)、Brugada 症候群 (BrS)を対象に遺伝子検査を行いその診断率の評価を行ったので報告する。

B. 研究方法

LQTS および BrS 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 KCNQ1(16exon), KCNE2(15exon), SCN5A(28exon) 遺伝子について塩基配列の決定を行った。

(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

平成 18 年 1 月から平成 20 年 1 月までに当遺伝子検査室で遺伝子検査を行った LQTS 発端者は 181 名であったが、遺伝子変異を検出したのは 83 名 (45%) で、LQT1 遺伝子 25 名、LQT2 遺伝子 44 名、LQT3 遺伝子は 14 名であった。また、そ

のうち、ミスセンス変異は 63 名、ナンセンス変異は 4 名、挿入欠失変異（フレームシフト変異）13 名、スプライシング変異は 3 名であった。

同時期の BrS 発端者は 64 名であったが、SCN5A 遺伝子変異を検出したのは 6 名で、ミスセンス変異は 4 名、ナンセンス変異は 1 名、挿入欠失変異（フレームシフト変異）1 名であった。

D. 考察

LQT 患者においては 45%に遺伝子変異を同定することができた。BrS についてはまだ同定率は低く、未知の原因遺伝子を探索する必要があると考えられる。

E. 結論

遺伝子診断が臨床で活用されることは遺伝性不整脈患者の臨床成績の向上に有用なことであったと考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sakaguchi T, Shimizu W, Itoh H, Noda T,

Miyamoto Y, Nagaoka I, Oka Y, Ashihara T, Ito M, Tsuji K, Ohno S, Makiyama T, Kamakura S, Horie M. Age- and Genotype-Specific Triggers for Life-Threatening Arrhythmia in the Genotyped Long QT Syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2008;19:794-799.

2. Nagaoka I, Shimizu W, Itoh H, Yamamoto S, Sakaguchi T, Oka Y, Tsuji K, Ashihara T, Ito M, Yoshida H, Ohno S, Makiyama T, **Miyamoto Y**, Noda T, Kamakura S, Akao M, Horie M. Mutation site dependent variability of cardiac events in Japanese LQT2 form of congenital long-QT syndrome. *Circ J.* 2008;72:694-699.

2. 学会発表
特になし

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

国立循環器病センター 遺伝子検査室

太田直孝、浦 敏郎

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, Antzelevitch C	Long QT syndrome.	Lang F (ed)	Molecular mechanisms of disease: an Encyclopedic reference	Springer	UK	2009	in press
清水 渉	8.不整脈薬物治療に関するガイドライン (2004)	山口 徹、北原光夫、福井次矢	『今日の治療指針』2008年版 付録「診療ガイドライン」	医学書院	東京	2008	1563-1569
清水 渉	潜在性QT延長症候群. III.不整脈	田邊晃久	循環器内科治療ガイドライン-最新の治療指針-	総合医学社	東京	2008	186-187
清水 渉	Q1. Brugada症候群とは? E.その他の不整脈疾患トピックス	小室一成、北風政史	専門医のための薬物療法	中外医学社	東京	2008	386-388
清水 渉	Q2. 無症候性Brugada心電図症例の考え方は? E.その他の不整脈疾患トピックス	小室一成、北風政史	専門医のための薬物療法	中外医学社	東京	2008	389-391
清水 渉	Q3. 遺伝性不整脈疾患には、どのようなものがあるのか? E.その他の不整脈疾患トピックス	小室一成、北風政史	専門医のための薬物療法	中外医学社	東京	2008	392-395
清水 渉	QT延長症候群の遺伝子解析		Annual Review 循環器 2009	中外医学社	東京	2009	203-209
清水 渉	遺伝学的検査と倫理. 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	井上 博、山下武志	不整脈クリニカルプラクティス～不整脈専門医をめざして～	南江堂	東京	2009	60-62
清水 渉	QT延長症候群. II章 臨床現場における不整脈 -実践的対処法	井上 博、山下武志	不整脈クリニカルプラクティス～不整脈専門医をめざして～	南江堂	東京	2009	216-223
清水 渉	7. ホルモンとの関係. VI.機序・病態	鎌倉史郎	「Brugada症候群 -病態解明から診断・治療指針の決定-」	メジカルビュー社	東京	2009	158-163

清水 渉	1) Brugada症候群とQT延長症候群. 2.ICDの実際: その適応と限界. VII. 植込み型除細動器(ICD), 自動体外式除細動器(AED)で治す	青沼和隆, 松崎益徳	「新・心臓病診療プラクティス」	文光堂	東京	2009	440-447
清水 渉	心室細動(QT延長症候群、Brugada症候群を含む). 第4章 不整脈・突然死・失神	川名正敏, 北風政史, 小室一成, 室原豊明, 山崎 力, 山下武志	『カラー版 循環器病学 基礎と臨床』	西村書店	東京	2009	印刷中
清水 渉	5. 特発性心室細動・Brugada症候群・先天性QT延長症候群、その他. I. デバイスが適応される疾患・病態の基礎知識	奥村 謙	「心臓リズムマネージメントを究める」	メジカルビュー社	東京	2009	印刷中
清水 渉	10. Brugada症候群. X.不整脈	堀 正二, 永井良三	「循環器疾患 最新の治療 2010-2011」	南江堂	東京	2009	印刷中
堀江 稔	不整脈治療薬の催不整脈作用	篠山重威, 矢崎義雄	循環器病疾患最新の治療	南江堂	東京	2008	325-326
堀江 稔	不整脈とイオン・チャンネル病	田邊 晃久	循環器内科治療ガイドラインー最新の診療指針ー.	総合医学社	東京	2008	184-185