

- 2260-2268, 2007
- 10) Antzelevitch C, Pollevick GD, Cordeiro JM, et al: Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation* 115: 442-449, 2007
 - 11) Watanabe H, Koopmann TT, Le Scouarnec S, et al: Sodium channel beta1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *J Clin Invest* 118: 2260-2268, 2008
 - 12) Delpón E, Cordeiro JM, Núñez L, et al: Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 1: 209-218, 2008
 - 13) Hu D, Barajas-Martinez H, Burashnikov E, et al: A mutation in the β_3 subunit of the cardiac sodium channel associated with Brugada ECG phenotype. *Circ Cardiovasc Genet* 2009 (in press)
 - 14) Bezzina CR, Shimizu W, Yang P, et al: Common sodium channel promoter haplotype in Asian subjects underlies variability in cardiac conduction. *Circulation* 113: 338-344, 2006
 - 15) Aiba T, Shimizu W, Hidaka I, et al: Cellular basis for trigger and maintenance of ventricular fibrillation in the Brugada syndrome model: high-resolution optical mapping study. *J Am Coll Cardiol* 47: 2074-2085, 2006
 - 16) Lambiase PD, Ahmed AK, Ciaccio EJ, et al: High-density substrate mapping in Brugada syndrome: combined role of conduction and repolarization heterogeneities in arrhythmogenesis. *Circulation* 120: 106-117, 2009
 - 17) Antzelevitch C, Brugada P, Borggrefe M, et al: Brugada syndrome. Report of the second consensus conference; endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association. *Circulation* 111: 659-670, 2005
 - 18) Miyamoto K, Yokokawa M, Tanaka K, et al: Diagnostic and prognostic value of a type 1 Brugada electrocardiogram at higher (third or second) V1 to V2 recording in men with Brugada syndrome. *Am J Cardiol* 99: 53-57, 2007
 - 19) 日本心電学会 Brugada 症候群自動診断ワーキンググループ: 本邦における Brugada 症候群に対する心電図自動診断基準. *心電図* 26: 758-767, 2006
 - 20) Matsuo K, Akahoshi M, Nakashima E, et al: The prevalence, incidence and prognostic value of the Brugada-type electrocardiogram: a population-based study of four decades. *J Am Coll Cardiol* 38: 765-770, 2001
 - 21) Junttila MJ, Gonzalez M, Lizotte E, et al: Induced Brugada-type electrocardiogram, a sign for imminent malignant arrhythmias. *Circulation* 117: 1890-1893, 2008
 - 22) Makita N, Behr E, Shimizu W, et al: The E1784K mutation in SCN5A is associated with mixed clinical phenotype of type 3 long QT syndrome. *J Clin Invest* 118: 2219-2229, 2008
 - 23) Shimizu W, Matsuo K, Kokubo Y, et al: Sex hormone and gender difference-role of testosterone on male predominance in Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 18: 415-421, 2007
 - 24) Brugada J, Brugada R, Antzelevitch C, et al: Long-term follow-up of individuals with the electrocardiographic pattern of right bundle-branch block and ST-segment elevation in precordial leads V1 to V3. *Circulation* 105: 73-78, 2002
 - 25) Priori SG, Napolitano C, Gasparini M, et al: Natural history of Brugada syndrome: insights for risk stratification and management. *Circulation* 105: 1342-1347, 2002
 - 26) Eckardt L, Probst V, Smits JP, et al: Long-term prognosis of individuals with right precordial ST-segment-elevation Brugada syndrome. *Circulation* 111: 257-263, 2005
 - 27) Kamakura S, Ohe T, Nakazawa K, et al: Long-term prognosis of probands with Brugada-pattern ST elevation in V1-V3 leads. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2009 (in press)
 - 28) Morita H, Nagase S, Miura D, et al: Differential effects of cardiac sodium channel mutations on initiation of ventricular arrhythmias in patients with Brugada syndrome. *Heart Rhythm* 6: 487-492, 2009
 - 29) Kusano KF, Taniyama M, Nakamura K, et al: Atrial fibrillation in patients with Brugada syndrome relationships of gene mutation, electrophysiology, and clinical backgrounds. *J Am Coll Cardiol* 51: 1169-1175, 2008
 - 30) Takagi M, Yokoyama Y, Aonuma K, et al: Japan Idiopathic Ventricular Fibrillation Study (J-IVFS) Investigators: Clinical characteristics and risk stratification in symptomatic and asymptomatic patients with Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 18: 1244-1251, 2007
 - 31) Morita H, Kusano KF, Miura D, et al: Fragmented QRS, as a marker of conduction abnormality and a predictor of prognosis in Brugada syndrome. *Circulation* 118: 1697-1704, 2008
 - 32) Ikeda T, Sakurada H, Sakabe K, et al: Assessment of noninvasive markers in identifying patients at risk in the Brugada syndrome: insight into risk stratification. *J Am Coll Cardiol* 37: 1628-1634, 2001
 - 33) Paul M, Gerss J, Schulze-Bahr E, et al: Role of programmed ventricular stimulation in patients with Brugada syndrome: a meta-analysis of worldwide published data. *Eur Heart J* 28: 2126-

- 2133, 2007
- 34) Brugada J, Brugada R, Brugada P: Determinants of sudden cardiac death in individuals with the electrocardiographic pattern of Brugada syndrome and no previous cardiac arrest. *Circulation* 108: 3092-3096, 2003
- 35) Benito B, Sarkozy A, Mont L, et al: Gender differences in clinical manifestations of Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol* 52: 1567-1573, 2008
- 36) Smits JP, Eckardt L, Probst V, et al: Genotype-phenotype relationship in Brugada syndrome: electrocardiographic features differentiate SCN5A-related patients from non-SCN5A-related patients. *J Am Coll Cardiol* 40: 350-356, 2002
- 37) Epstein AE, DiMarco JP, Ellenbogen KA, et al: ACC/AHA/HRS 2008 guidelines for device-based therapy of cardiac rhythm abnormalities. a report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines. *Circulation* 117: e350-408, 2008
- 38) 大江 透, 相澤義房, 新 博次, 他: QT 延長症候群(先天性・二次性)と Brugada 症候群の診療に関するガイドライン. *Circulation J* 71(suppl IV): 1205-1253, 2007
- 39) Haïssaguerre M, Derval N, Sacher F, et al: Sudden cardiac arrest associated with early repolarization. *N Engl J Med* 358: 2016-2023, 2008

許諾済複写物シールについてのお知らせ

一般社団法人 出版者著作権管理機構 (JCOPY)

JCOPY が許諾した複写物には、許諾済複写物シールが貼付されています。

出版者著作権管理機構 (JCOPY) が正規に許諾した複写物のうち、

- ①スポット契約(個人や団体の利用者が複写利用のつと事前に申告して JCOPY がこれを許可する複写利用契約)の複写物
- ②利用者による第三者への頒布を目的とした複写物
- ③JCOPY と利用契約を締結している複写事業者(ドキュメントサプライヤー, DS)が提供する複写物

については、当該複写物が著作権法に基づいた正規の許諾済複写物であることを証明するため、下記見本の「許諾済複写物シール」を2009年7月1日より複写物に貼付いたします。

なお、社内利用を目的とした包括契約(自社の保有資料を自社で複写し、自社内で使用)分の複写物にはシール貼付の必要はありません。

許諾済複写物シールについてのお問い合わせは、
出版者著作権管理機構 (JCOPY) <http://jcopy.or.jp/>までお願い申し上げます。
電話 03-3513-6969, Fax 03-3513-6979, E-mail: info@jcopy.or.jp



シール見本 (実物は直径 17mm)

Brugada症候群における突然死

鎌倉史郎*

abstract

Brugada症候群における突然死の機序は、遺伝子変異を背景として、相対的な外向きの電流が増加することにより、右室流出路心外膜側で活動電位持続時間のばらつきが生じて、phase 2 reentryが発生するためと説明されている。ただ最近では、心室細動 (VF) が出現するには、これら再分極の異常に加え、右室における脱分極の異常 (伝導遅延) が必要と考えられている。本邦のBrugada症候群の予後は欧米とは異なり、失神群、無症候群で良好であることが循環器病委託研究、J-IVF研究で明らかになった。一方、VF群では心電図波形がType1、非Type1に関係なく、約10%/年の頻度で心事故を発生する。心事故の予測因子として欧米では、男性、失神、自然発生のType1心電図、EPSでのVF/多形性心室頻拍誘発などが報告されている。しかしながら本邦ではこれらの指標は有用でなく、70歳未満での突然死の家族歴と、下後壁誘導の早期再分極が独立した予測因子であった。

I はじめに

Brugada症候群とは12誘導心電図で右脚ブロック様波形と、 V_1 ~ V_3 誘導におけるcoved型またはsaddleback型のST上昇を呈し、主として若年~中年男性が夜間に心室細動 (VF) を引き起こして突然死する疾患である¹⁾。本症候群にはVFや失神等の症状を伴う有症候群と、心電図異常を有するが症状のない無症候群がある。本疾患は遺伝性不整脈疾患であり、心筋のNaチャンネルのSCN5A遺伝子変異の他、L型Caチャンネル遺伝子の変異など、これまでに計7つの原因遺伝子が同定されている。本疾患は日本人に多く、植込み型除細動器 (ICD) 植込みが必要とされる数は、虚血性心疾患、拡張型心筋症、肥大型心筋症に次いで多い。

本稿ではBrugada症候群における突然死の機序、本邦での突然死の実態、治療法などについて述べる。

II 突然死の機序

1 ST上昇の機序

Brugada症候群では現在SCN5A, GPDIL, CACNA1C, CACNB2b, SCN1B, KCNE3, SCN3Bの7種の遺伝子変異が同定されている^{2)~7)}。またSCN5Aの転写領域に、3つの組み合わせ (ハプロタイプ) で連鎖する多型も同定されている⁸⁾。

Brugada症候群では、これらの遺伝子変異や多型を背景として、右室流出路心外膜側で内向きのNa電流やCa電流などが減少する結果、 I_{to} など相対的な外向き電流が増加して、活動電位第1相のnotchが大きくなり、心外膜-心内膜間に電位勾配が生じる。それによりJ波の増大に引き続いてST上昇が起こる。さらに相対的な内向き電流が減少すると、第2相のdome形成が遅延し、心内膜側より心外膜側で再分極が遅れて、ST上昇に加えT波の陰転が生じることが動物実験で証明されている⁹⁾。

* 国立循環器病センター心臓血管内科部長

2 VFの発生機序

心外膜側で相対的な内向き電流がさらに減少するとdomeが消失し、周囲との間に大きな電位勾配が生じるために、domeの消失した心筋において再脱分極が起こる。これはphase 2 reentryとよばれ、VFの起源であると考えられている。ただ、このphase 2 reentryによる1発目の心室期外収縮(PVC)は、domeの消失だけでは発生せず、心外膜側の局所的な再分極のばらつきが必要になる。またその後PVCが持続し、VFが生じるためには、再分極異常だけでは説明できず、軽度の脱分極が必要であることがAibaらの実験で指摘されていた¹⁰⁾。

最近Lambiaseらは、Brugada症候群例にEnsightのマッピングシステムを用いて、早期刺激時の右室心内膜局所の伝導特性、再分極特性を、種々の指標を用いて解析し、さらに電気刺激によるVF発生部位と伝導遅延部位との相関を検討した¹¹⁾。その結果、本症候群では短い連結期での刺激で右室前壁に著明な伝導遅延が生じるとともに、空間的な再分極のばらつきと、回復曲線に急峻な傾斜が生じ、伝導遅延と伝導ブロックが生じた部位からVFが発生することを確認した。彼らは、VFは局所の伝導遅延と再分極異常の両方の機序に基づいて発生するとし、特に重要なのは局所の伝導遅延であると主張している。

これまでBrugada症候群では、貫壁性および心外膜層内で再分極時間のばらつきが生じて、phase 2 reentryからVFが発生するという、“再分極仮説”

が主流となっていた。一方、右室局所の伝導遅延に原因を求める“脱分極仮説”も少数意見として支持されていた。Aiba, Lambiaseらの研究は、VF発生には再分極異常と脱分極異常の両方が必要であることを示したといえる(図1)。

3 ST上昇とVF

Brugada症候群では副交感神経刺激により、L型Ca電流が減少してST上昇を引き起こす。また徐脈により I_{to} 電流が増加して、STをさらに上昇させる。このため、Brugada症候群では副交感神経の緊張時、または交感神経の緊張低下時にVF発作が生じやすい。失神は安静時または夜間睡眠中に生じやすいのが特徴で、その際、約半数でPVCが認められる。また電気生理学的検査(EPS)では2連発または3連発の心室早期期外刺激で50~80%の例にVFや多形性心室頻拍(VT)が誘発され、その誘発率は無症候群よりも有症候群で有意に高い¹²⁾。

このほか、Brugada症候群にST上昇をもたらすものとして、Naチャンネル遮断薬のほか、Ca拮抗薬、 β 遮断薬、狭心症薬、向精神薬、麻酔薬、低K血症、発熱等が指摘されている⁹⁾。このうち、実際に突然死が複数例で報告されているのは、プロポフォールなどの麻酔薬と発熱であり、いずれもNa電流の低下に由来すると考えられている¹³⁾。一方、Brugada症候群では、運動負荷中やイソプロテレノール投与中にはST上昇が改善するが、運動負荷後や投与後には再上昇することが多い。

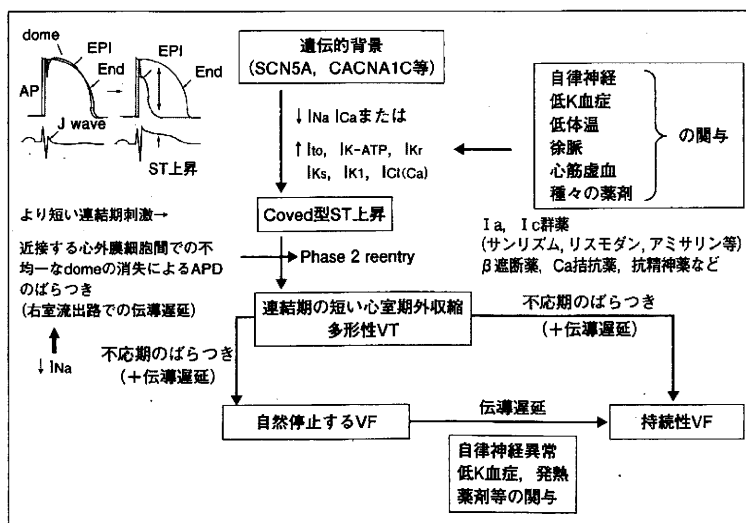


図1 Brugada症候群のST上昇とVF発生機序 [文献9)より引用改変]

III 心電図分類

米国および欧州Heart Rhythm学会は V_1 ~ V_3 誘導のST異常を3つのタイプに分類し、いずれもJ点で0.2mV以上の上昇があるが、coved型でT波が陰転しているものをType1、ST終末部が0.1mV以上上昇していてsaddleback型を呈し、T波が陽性または二相性のものをType2、ST終末部の上昇が0.1mV未満で、saddleback型またはcoved型で、かつT波が陽性のものをType3と定義している⁹⁾。ただType1波形が自然の状態、またはピルジカイニドなどのNaチャンネル遮断薬による薬物負荷後に認められる場合はBrugada型心電図としてもよいが、負荷後においても、Type2やType3にとどまる場合はBrugada型とは断定できないとする意見が主流である。

しかしながらType2またはType3であっても高位肋間(1~2肋間上方)で V_1 ~ V_3 誘導を記録すると、Type1心電図を示す場合があり、その予後は通常部位でType1を示す例と変わらないことが示されている¹⁴⁾。また、Type1、2、3に合致しないBrugada様心電図波形(例えばJ点波高が0.1~0.2mVのもの)も数多く認められる。さらにType3波形は、Type1またはType2波形に付随している場合が多く、 V_1 ~ V_3 誘導でType3波形だけが認められる例は極めて少ない(数%以下)のが事実である。

IV Brugada症候群の予後

これまでBrugada症候群においては、J点で2mm以上の電位を有するcoved型ST上昇(Type1心電図)例だけを対象として登録研究がなされ、その予後が検討されてきた。しかしながら、無症候群を含めて、すべての症例の予後が悪いという結果と、すべての予後は良好であるという、全く相反する結果が報告され、はたしていずれが正しいのかが不明であった^{15)~17)}。また、それらの結果に基づいて治療ガイドラインが報告されていたが⁹⁾、それが日本人に適しているかは疑問であった。このため、2001年から厚生労働省の循環器病委託研究と、特発性心室細動研究会によるJ-IVF研究が開始され、Brugada症候群の予後が

前向きで検討された^{12), 18)}。

その結果、いずれの研究においても無症候群と失神群の予後は良好で、VF群の予後は不良であった。委託研究では非Type1心電図(Type2、Type3、J点で1mm以上2mm未満のcoved型またはsaddleback型ST上昇)を有する症例の予後も検討された。それによると、非Type1群もType1群と同様な予後を示し、VF既往例では約10%/年の頻度で心事故を生じていた(図2)¹²⁾。

V 心事故(突然死)予測因子

1 無症候群と失神群の予測因子

これまで欧米では男性、失神、自然の状態でのType1心電図が記録される例、EPSでのVF/多形性VT誘発例が、無症候群と失神群における不良な予後を予測する因子とされている^{15)~17), 19)}。一方、突然死の家族歴は欧米では予測因子とされていなかった。これは欧米の報告が家系を多く含むために、突然死の家族歴を有する症例の比率が25~55%にもなると^{15)~17)}、家族歴を有さない症例との差が出なかったと考えられる。これに対して、委託研究では発端者だけを対象として経過観察した結果、45歳または70歳未満における突然死の家族歴が心事故の独立した予測因子であった¹²⁾。また突然死の家族歴を有するものは14%に過ぎなかった。一方、無症候群と失神群において従来報告された因子(失神、自然のType1心電図、EPSでのVF/多形性VT誘発)は、本邦では予測に有用ではなかった。

2 すべての群における予測因子

VF群を含めた全症例の多変量解析に関しては、委託研究では、突然死の家族歴と、下後壁誘導での早期再分極の合併が不良な予後の独立した予測因子であり、Type1群では、突然死の家族歴と早期再分極合併が、非Type1群では突然死の家族歴が有意な心事故予測因子であった(図3)¹²⁾。一方、J-IVF研究では、心房細動(AF)の既往例で心事故発生率が高く、また V_2 誘導でのr-J間隔 ≥ 90 msec以上と、 V_6 誘導でのQRS幅 ≥ 90 msecが心事故の有意な予測因子であった¹⁸⁾。

性差については、本邦では女性例が極めて少ない

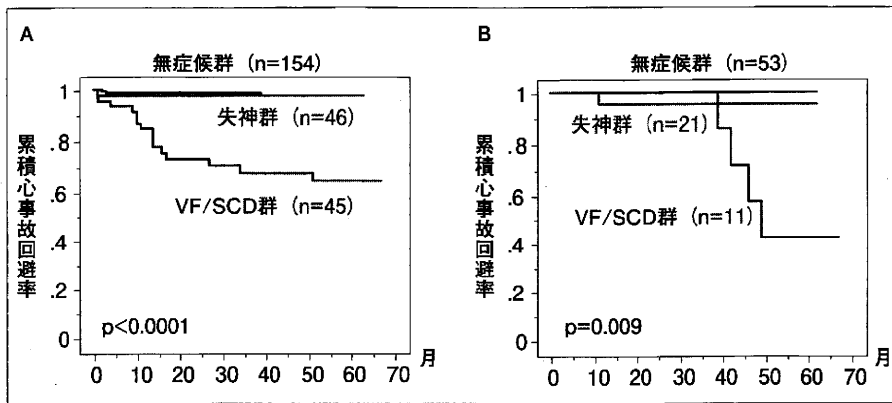


図2
循環器病委託研究の登録例（発端者）の予後
A図：Type1群の症状別の累積心事故回避率
B図：非Type1群の症状別の累積心事故回避率

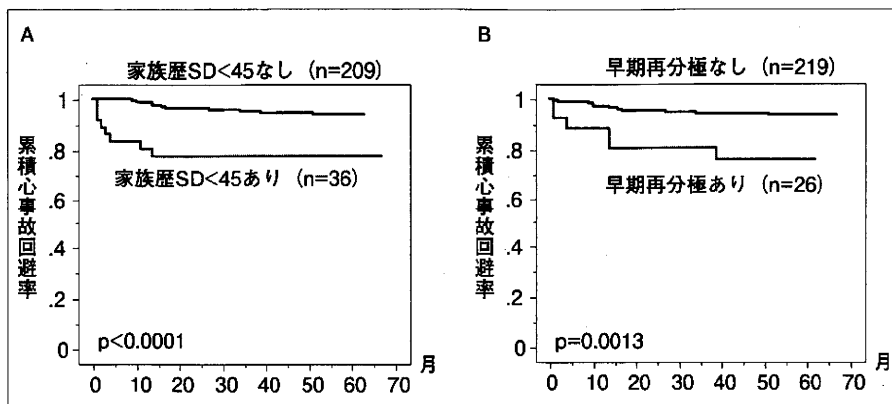


図3
循環器病委託研究のType1群における指標別の予後
A図：突然死家族歴を有する例と有さない例の累積心事故回避率
B図：早期再分極を有する例と有さない例の累積心事故回避率

ことから評価できなかった。最近Benitoらは、単変量解析において女性は男性に比べ有意に予後が良く、PR時間の延長した例に心事故が生じやすかったが、多変量解析では性差は独立した予測因子でなかったと報告している²⁰⁾。彼らの報告には従来の欧米の報告と同様に家系例が多数含まれている。そのため、性差が真の予後予測因子か否かを解明するには、発端者のみを集積した、より長期間の大規模観察研究が必要と考えられる。

Brugada症候群が遺伝性疾患であることから、遺伝子変異が予後に影響する可能性は高い。これまでSCN5A変異を有する例では、ない例に比べてPQ時間、HV時間が延長しており、加齢とともにPQ時間とQRS時間が延長する。また変異例では心房内伝導時間が有意に長く、AF誘発率も高いと報告されている²¹⁾。しかしながら、遺伝子変異が予後の予測に関して有用であるとの報告はいまだなされていない。この原因として、Brugada症候群の変異例における浸透率の低さが挙げられている。遺伝子変異と予後

との関係に関しても、性差と同様に、多数の発端者における検討が今後必要となろう。

VI 治療

1 非薬物治療

本邦における予後調査結果から、Brugada症候群でVFの既往がある場合は、心電図波形に関係なくICD植込みが必要と考えられる。

一方、欧米のガイドラインでは、失神例とVTを有する例はICD植込みの適応（クラスIIa）とされており²²⁾、無症候群に関しても、かつてはEPSによるVF誘発例でのICD植込みの必要性が強調されていた⁹⁾。しかしながら、夜間の心肺停止を伴うような失神はVFと同様に扱ってもよいが、それ以外の失神は真に不整脈由来か否かの鑑別が難しい。現に本邦の調査研究では失神群の予後は極めて良好であった。またBrugada症候群で認められるVTは、多形性VTではなく、特発性の流出路起源の単形性

	Coved (type1) 型 (自然or薬物)						
	+	+	+	+	-	-	-
失神	+	+	+	+	-	-	-
突然死家族歴	+	+	-	-	+	+	-
VF誘発	+	-	+	-	+	-	+
クラス分類	IIa	IIa	IIa	IIb	IIa	IIb	IIb

表1
QT延長症候群 (先天性・二次性) とBrugada症候群の診療に関するガイドラインにおけるBrugada症候群のICD植込み適応
クラスI : 心停止・心蘇生例, 自然停止するVF/多形性VTが確認されている例
クラスII : Brugada型心電図を有する例 (薬物負荷, 1肋間上の心電図記録例も含む) で, 失神, 家族歴, VF誘発のうち, 2つ以上の指標があればIIa, ひとつだとIIbとする
〔文献23〕より引用〕

非持続性VTである場合が多く, 予後との関連も不明である。さらにEPSによるVF誘発は近年ではその意義が疑問視されている。以上より本邦では欧米とは異なる治療基準が必要と考えられている。

このため, 2007年12月に発表された日本循環器学会の診療ガイドライン²³⁾では, 失神群, 無症候群においては, VF誘発や失神をICD植込み条件を満たす単独の指標とはせず, 失神, 突然死家族歴, EPSでのVF誘発のうち2つ以上を満たす場合をクラスIIa, それ以外はクラスIIbの適応としている。本ガイドラインは現時点で最も妥当な指針と思われるが, 一方で, 対象をType1例に限定していることと, 失神例の取り扱いやEPSの意義に関して, 若干議論の余地を残している (表1)。

2 薬物治療

VF多発時の薬物治療としてはイソプロテレノールの持続点滴が有用である。VF予防の経口薬としては, これまで β 刺激薬や, I_{to} チャネル遮断作用のある薬物 (キニジン, ペプリジルなど), Ca電流を増加させるシロスタゾールが有効と報告されている。しかしながらこれらの薬剤はVFを完全に抑制するまでには至らないため, 無症候群の1次予防には用いられていない。

一方, Brugada症候群でAFや冠攣縮性狭心症, 神経調節性失神を伴うことが少なくない。この際, Naチャネル遮断薬やCa拮抗薬, β 遮断薬, 向精神薬等が使用される可能性があるが, これらの薬剤では心筋のイオン電流を変化させて, STを上昇させることが報告されている。このすべてがBrugada症候群例にVFを発生させるわけではないが, 治療の際にはその選択に十分な留意が必要となろう。

参考文献

- 1) Brugada P, Brugada J : Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death : a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. *J Am Coll Cardiol* 20 : 1391-1396, 1992
- 2) Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, et al : Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 392 : 293-296, 1998
- 3) London B, Michalec M, Mehdi H, et al : Mutation in glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) decreases cardiac Na^+ current and causes inherited arrhythmias. *Circulation* 116 : 2260-2268, 2007
- 4) Antzelevitch C, Pollevick GD, Cordeiro JM, et al : Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation* 115 : 442-449, 2007
- 5) Watanabe H, Koopmann TT, Le Scouarnec S, et al : Sodium channel beta1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *J Clin Invest* 118 : 2260-2268, 2008
- 6) Delpón E, Cordeiro JM, Núñez L, et al : Functional effects of KCNE3 Mutation and its role in the development of Brugada syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 1 : 209-218, 2008
- 7) Hu D, Barajas-Martinez H, Burashnikov E, et al : A mutation in the $\beta 3$ subunit of the cardiac sodium channel associated with Brugada ECG phenotype. *Circ Cardiovasc Genet* 2, 2009 (in press)
- 8) Bezzina CR, Shimizu W, Yang P, et al : Common sodium channel promoter haplotype in asian subjects underlies variability in cardiac conduction. *Circulation* 113 : 338-344, 2006
- 9) Antzelevitch C, Brugada P, Borggrefe M, et al : Brugada syndrome : report of the second consensus conference : endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association. *Circulation* 111 : 659-670, 2005
- 10) Aiba T, Shimizu W, Hidaka I, et al : Cellular basis for trigger and maintenance of ventricular fibrillation in the Brugada syndrome model : high-resolution optical mapping study. *J Am Coll Cardiol* 47 : 2074-2085, 2006
- 11) Lambiase PD, Ahmed AK, Ciaccio EJ, et al : High-density substrate mapping in Brugada syndrome : combined role of conduction and repolarization heterogeneities in arrhythmogenesis. *Circulation* 120 : 106-117, 2009
- 12) Kamakura S, Ohe T, Nakazawa K, et al : Long-term prognosis of probands with Brugada-pattern ST-elevation in leads V1-V3. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2 : 495-503, 2009

- 13) Junttila MJ, Gonzalez M, Lizotte E, et al : Induced Brugada-type electrocardiogram, a sign for imminent malignant arrhythmias. *Circulation* **117** : 1890-1893, 2008
- 14) Miyamoto K, Yokokawa M, Tanaka K, et al : Diagnostic and prognostic value of a type I Brugada electrocardiogram at higher (third or second) V1 to V2 recording in men with Brugada syndrome. *Am J Cardiol* **99** : 53-57, 2007
- 15) Brugada J, Brugada R, Antzelevitch C, et al : Long-term follow-up of individuals with the electrocardiographic pattern of right bundle-branch block and ST-segment elevation in precordial leads V1 to V3. *Circulation* **105** : 73-78, 2002
- 16) Priori SG, Napolitano C, Gasparini M, et al : Natural history of Brugada syndrome : insights for risk stratification and management. *Circulation* **105** : 1342-1347, 2002
- 17) Eckardt L, Probst V, Smits JP, et al : Long-term prognosis of individuals with right precordial ST-segment-elevation Brugada syndrome. *Circulation* **111** : 257-263, 2005
- 18) Takagi M, Yokoyama Y, Aonuma K, et al : Japan Idiopathic Ventricular Fibrillation Study (J-IVFS) Investigators : Clinical characteristics and risk stratification in symptomatic and asymptomatic patients with brugada syndrome : multicenter study in Japan. *J Cardiovasc Electrophysiol* **18** : 1244-1251, 2007
- 19) Brugada J, Brugada R, Brugada P : Determinants of sudden cardiac death in individuals with the electrocardiographic pattern of Brugada syndrome and no previous cardiac arrest. *Circulation* **108** : 3092-3096, 2003
- 20) Benito B, Sarkozy A, Mont L, et al : Gender differences in clinical manifestations of Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol* **52** : 1567-1573, 2008
- 21) Kusano KF, Taniyama M, Nakamura K, et al : Atrial fibrillation in patients with Brugada syndrome relationships of gene mutation, electrophysiology, and clinical backgrounds. *J Am Coll Cardiol* **51** : 1169-1175, 2008
- 22) Epstein AE, DiMarco JP, Ellenbogen KA, et al : ACC/AHA/HRS 2008 Guidelines for Device-Based Therapy of Cardiac Rhythm Abnormalities : a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the ACC/AHA/NASPE 2002 Guideline Update for Implantation of Cardiac Pacemakers and Antiarrhythmia Devices) developed in collaboration with the American Association for Thoracic Surgery and Society of Thoracic Surgeons. *Circulation* **117** : e350-e408, 2008
- 23) 大江透ほか : QT延長症候群 (先天性・二次性) とBrugada症候群の診療に関するガイドライン. *Circulation J* **71** (supplIV) : 1205-1253, 2007

Brugada症候群：診療方針up-to-date

Brugada syndrome : update on the diagnosis and management



鎌倉 史郎

Shiro KAMAKURA

国立循環器病研究センター心臓血管内科

©Brugada 症候群は遺伝性不整脈疾患で、アジア人に多いとされており、心筋の Na チャネルの SCN5A 遺伝子のほか、L 型 Ca チャネル遺伝子など、計 7 種の遺伝子変異が同定されている。これまで Brugada 症候群の実験モデルでは、心外膜-心内膜の再分極相で電位勾配が生じて ST 上昇が起こるとともに、貫壁性および心外膜層内で再分極時間のばらつきが生じて心室細動(VF)が発生すると報告され、その発生機転を再分極異常に求める考え方が主流であった。しかし、近年になって右室局所における伝導遅延がヒトで証明され、伝導遅延が VF 発生に必須であることが報告されるに至り、再分極異常よりもむしろ脱分極異常の重要性が認識されつつある。一方、日本人の Brugada 症候群例の予後には VF の既往、突然死の家族歴、SCN5A 遺伝子変異、下側壁誘導での早期再分極症候群の合併などが関連することが報告され、これらの指標に基づいて治療方針を決定するためのガイドラインが策定されている。



Brugada症候群，心室細動(VF)，早期再分極，植込み型除細動器(ICD)，ST上昇

Brugada 症候群とは 12 誘導心電図で右脚ブロック様波形と、 $V_1 \sim V_3$ 誘導における coved 型または saddleback 型の ST 上昇を呈し、主として若年～中年男性が夜間に心室細動(VF)を引き起こして突然死する疾患である¹⁾。本症候群には VF や失神などの症状を伴う有症候群と、心電図異常を有するが症状のない無症候群がある。本疾患は遺伝性不整脈疾患であり、心筋の Na チャネルの SCN5A 遺伝子変異のほか、L 型 Ca チャネル遺伝子の変異など、これまでに計 7 つの原因遺伝子が報告されている。

本稿では、主として Brugada 症候群の機序や治療に関する最近の知見を述べる。

Brugada症候群の成因

1. 原因遺伝子

Brugada 症候群では 1998 年に、Na チャネル α サブユニットをコードする SCN5A 遺伝子の変異 (BS1) がはじめて報告された²⁾。その後、新しい原因遺伝子の発見がなかったが、2007 年になり

GPD1L 遺伝子変異 (BS2) と³⁾、L 型 Ca チャネルの $\alpha 1$ サブユニットの CACNA1C 遺伝子 (BS3)、および $\beta 2b$ サブユニットの CACNB2 β 遺伝子の変異 (BS4) が報告された⁴⁾。2008 年には Na チャネル $\beta 1$ サブユニットの SCN1B 変異 (BS5)⁵⁾ と K チャネル β サブユニットをコードする KCNE3 変異 (BS6)⁶⁾ が報告され、2009 年になって Na チャネル $\beta 3$ サブユニットの SCN3B 変異由来の Brugada 症候群 (BS7) の存在が確認された⁷⁾。これら 7 つの遺伝子変異のうち SCN5A, GPD1L, SCN1B, SCN4B では Na 電流を減少させる loss of function が、CACNA1C と CACNB2b では L 型 Ca 電流を減少させる loss of function が、KCNE3 では Ito 電流を増加させる gain of function が Brugada 症候群の成因となっている。このほかに、KCNQ1, KCNE5 などの遺伝子変異と Brugada 症候群との関連も指摘されている。

ただ、Brugada 症候群のうちでこれらの遺伝子変異が見つかるのは 15～30%程度にすぎず、それ以外の症例にどのような遺伝子異常があるかは

まだ不明である。このため、Brugada 症候群では QT 延長症候群と同様に、今後種々の原因遺伝子が同定されると考えられている。

一方、遺伝子変異ではなく、遺伝子多型により軽症の Brugada 症候群がもたらされる可能性が指摘されている。Bezzina, Shimizu らは SCN5A の転写領域に、3 つの組合せ(ハプロタイプ)で連鎖する 6 つの多型を同定した。このうち、ハプロタイプ B がアジア人にのみ存在し、転写活性や心臓の興奮伝導能を SCN5A 変異例ほどではないが低下させていることを報告した⁸⁾。このハプロタイプは Brugada 症候群の直接原因ではないが、本症候群がアジア人に多いという人種差を説明するものと考えられている。

2. ST 上昇と心室細動の発生機序

Brugada 症候群では遺伝子変異を背景として右室流出路心外膜側で内向きの Na 電流や Ca 電流などが減少する結果、Ito など相対的な外向き電流が増加して活動電位第 1 相の notch が大きくなり、心外膜-心内膜間に電位勾配が生じる。それにより J 波の増大に引き続いて ST 上昇が起こる。さらに、相対的な内向き電流が減少すると、第 2 相の dome 形成が遅延し、心内膜側より心外膜側で再分極が遅れて、ST 上昇に加え T 波の陰転が生じることが、イヌの動脈灌流右室心筋切片を用いた実験モデルで証明されている⁹⁾。

この相対的な内向き電流がさらに減少すると心外膜側で dome が消失し、周囲との間に大きな電位勾配が生じるために、dome の消失した心筋において再脱分極が起こる。これは phase 2 リエントリーとよばれ、VF の起源であると考えられている。ただ、この phase 2 リエントリーによる 1 発目の心室期外収縮(PVC)は dome の消失だけでは発生せず、心外膜側の局所的な再分極のばらつきが必要になる。また、PVC が持続し、VF が持続するためには再分極異常だけでは説明できず、軽度の脱分極が必要であることが Aiba らの報告で指摘されている¹⁰⁾。

最近 Lambiase らは、Ensite のマッピングシステムを用いて早期刺激時の右室心内膜局所の伝導特性、再分極特性を種々の指標を用いて解析し、さらに電気刺激による VF 発生部位と伝導遅延部位

との相関を検討した¹¹⁾。その結果、Brugada 症候群では短い連結期での刺激で右室前壁に著明な伝導遅延が生じるとともに、空間的な再分極のばらつきと、回復曲線に急峻な傾斜が生じ、伝導遅延と伝導ブロックが生じた部位から VF が発生することを確認した。彼らは VF は局所の伝導遅延と再分極異常の両方の機序に基づいて発生するとし、重要なのは局所の伝導遅延であると主張している。

これまで Brugada 症候群例では貫壁性および心外膜層内で再分極時間のばらつきが生じて、phase 2 リエントリーから VF が発生するという“再分極仮説”が主流となっていた。一方、右室局所の伝導遅延に原因を求める“脱分極仮説”も少数意見として支持されていた。Nagase らは右室流出路の心外膜側で遅延電位が存在することを指摘し¹²⁾、Morita らは心室内の伝導遅延に関連する QRS 波の fragmentation が一定数以上存在する(multiple spike)例では予後が悪いと報告した¹³⁾。また、Coronel らは、移植のために摘出した Brugada 症候群または SCN5A 変異のある例の心臓では、ST 期に再分極異常を示唆する有意な所見が存在せず、コンピュータシミュレーションで右室局所に伝導遅延を作成した場合に、Brugada 様の ST 変化が出現すると報告している¹⁴⁾。このほか、Lambiase の見解を支持するような臨床面での報告もめだつようになっており、近年では Brugada 症候群における脱分極仮説が再分極仮説よりも重要視される傾向にある。

● Brugada 症候群の予後

これまで Brugada 症候群においては、J 点で 2 mm 以上の電位を有する coved 型 ST 上昇(Type 1 心電図)例だけを対象として登録研究がなされ、その予後が検討されてきた。しかし、無症候群を含めて、すべての症例の予後が悪いという結果と、すべての予後は良好であるという、まったく相反する結果が報告され、はたしていずれが正しいかが不明であった¹⁵⁻¹⁷⁾。また、それらの結果に基づいて治療ガイドラインが報告されていたが¹⁸⁾、それが日本人に適しているかは疑問であった。このため、2001 年から厚生労働省の循環器病委託研

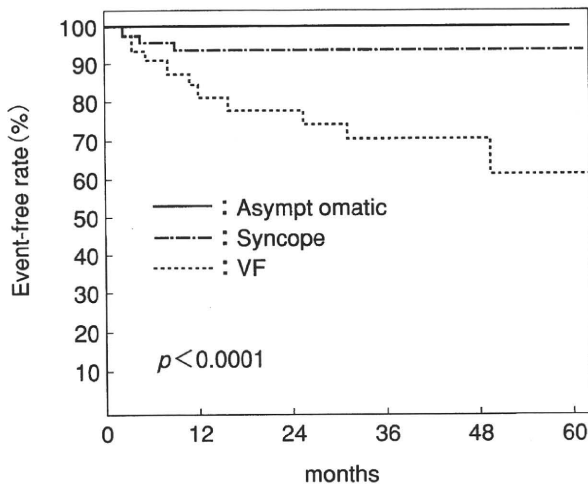


図1 J-IVF研究での登録症例全体の症状別の累積心事故回避率²⁰⁾

究と、特発性心室細動研究会によるJ-IVF研究が開始され、Brugada症候群の予後が前向きで検討された^{19,20)}。

その結果、いずれの研究においても無症候群と失神群の予後は良好で、VF群の予後は不良であった(図1, 2)。これらの結果は最近報告されたFINGER研究の各群の予後ともほぼ一致していた²¹⁾。委託研究では非Type 1心電図(Type 2, Type 3, J点で1 mm以上2 mm未満のcovedまたはsaddleback型ST上昇)を有する症例の予後も検討された。それによると、非Type 1群もType 1群と同様な予後を示し、VF既往例では約10%/yrの頻度で心事故を生じていた(図2)。

● 心事故予測因子

1. すべての群における予測因子

欧米における大規模研究では、①男性、②VFまたは失神の既往、③自然発生のType 1心電図、④電気生理学検査(EPS)でのVF/多形性VT誘発(3連発までの早期刺激、最小連結期 ≥ 200 msec)などが、Brugada症候群における不良な予後を予測する因子とされている¹⁵⁻¹⁷⁾。一方、突然死の家族歴は予測因子とされていない。これは欧米の報告が家系例を多く含むために、家族歴を有する例と有さない例の間に差が出なかったためとも考えられる。FINGER研究においても多変量解析で有意差が認められたのは症状と自然発生のType 1心電図のみであった²¹⁾。一方、委託研究ではVFの既往、45歳未満での突然死の家族歴と、下側壁誘導での早期再分極の合併が全症例(Type 1群+非Type 1群)における不良な予後の独立した予測因子であり(図3)¹⁹⁾、Type 1群ではVFの既往、突然死の家族歴と早期再分極合併が、非Type 1群ではVFの既往、突然死の家族歴が有意な心事故予測因子であった。J-IVF研究では心房細動(AF)の既往例で心事故発生率が高く、またV₂誘導でのr-J間隔 ≥ 90 msec以上と、V₆誘導でのQRS幅 ≥ 90 msecが心事故の有意な予測因子であった²⁰⁾。

Brugada症候群が遺伝性疾患であることから、遺伝子変異が予後に影響する可能性は高い。これまでSCN5A変異を有する例では、ない例に比べ

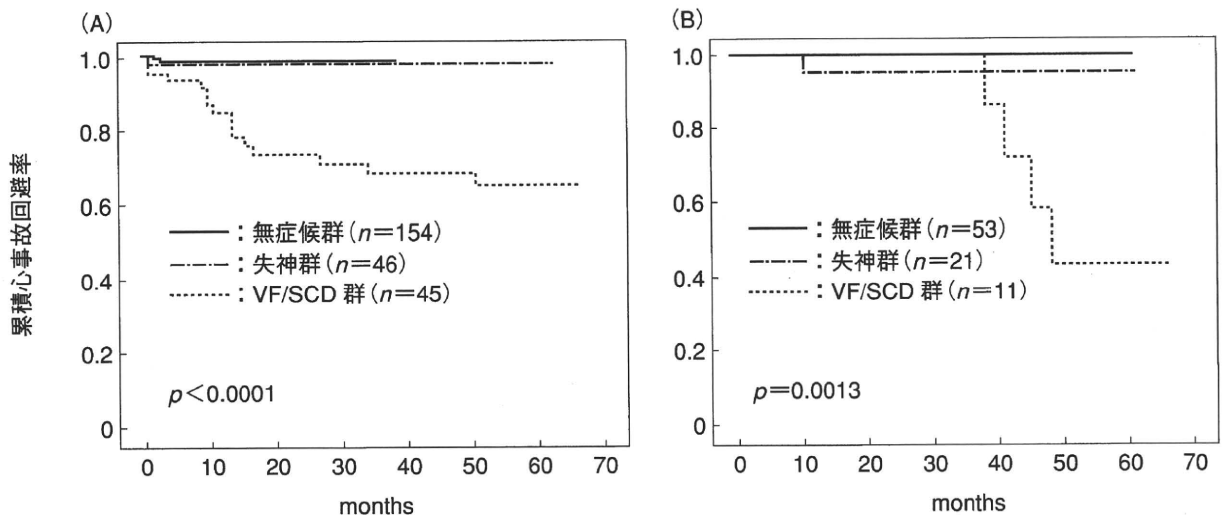


図2 循環器病委託研究の登録例(発端者)の予後

A: Type 1群の症状別の累積心事故回避率。

B: 非Type 1群の症状別の累積心事故回避率。

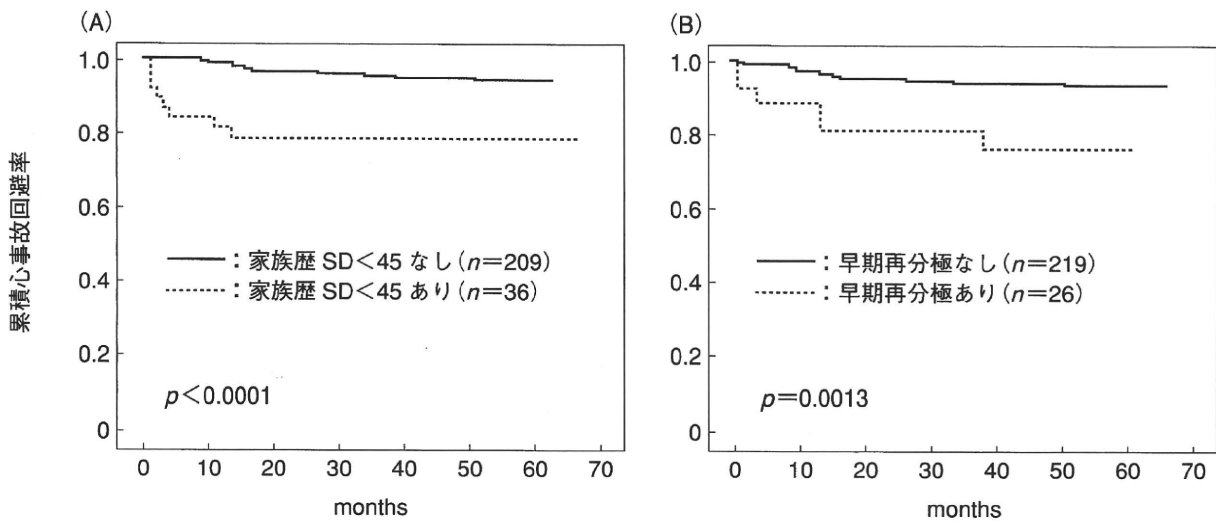


図3 循環器病委託研究のType 1群における指標別の予後

A: 45歳未満での突然死家族歴を有する例と有さない例の累積心事故回避率。
 B: 下側壁早期再分極を有する例と有さない例の累積心事故回避率。

てPQ時間・HV時間が延長しており、加齢とともにPQ時間とQRS時間が延長する。また、変異例では心房内伝導時間が有意に長く、AF誘発率も高いと報告されている。しかし、遺伝子変異が予後の予測に関して有用であるとの報告はいまだなされていない。この原因として、Brugada症候群の変異例における浸透率の低さがあげられる。現在、厚生労働科学研究でBrugada症候群の発端者におけるSCN5A遺伝子変異と予後との関係が検討されており、遺伝子変異が不良な予後の予測因子になりうるとの中間解析結果が報告されている。

2. 無症候群と失神群の予測因子

欧米では、①男性、②失神の既往、③自然発生のType 1心電図、④EPSでのVF/多形性VT誘発などが、無症候群と失神群における不良な予後を予測する因子とされている^{15-17,22}。しかし、700例近くの無症候例を集積したFINGER研究の単変量解析で、EPSでのVF誘発がかろうじて有意との結果が得られたものの、多変量解析ではどの因子も有意差がでなかった²¹。わが国においても、J-IVF研究では無症候群と失神群において心事故を予測する因子はみつからなかったが、委託研究では45歳未満における突然死の家族歴が唯一、心事故の独立した予測因子になると報告された¹⁹。

● Brugada症候群の治療

1. 非薬物治療

わが国における予後調査結果から、Brugada症候群でVFの既往がある場合は心電図波形に関係なく植込み型除細動器(ICD)が必要と考えられる。

一方、欧米のガイドラインでは失神例、VTを有する例もICD植込みの適応(クラスIIa)とされており²³、無症候群に関しても、かつてはEPSによるVF誘発例でのICD植込みの必要性が強調されていた¹⁸。しかし、夜間の心肺停止を伴うような失神はVFと同様に扱ってもよいが、それ以外の失神は真に不整脈由来かどうかの鑑別が難しい。現にわが国の調査研究では失神群の予後はきわめて良好であった。また、Brugada症候群で認められるVTは多形性VTではなく、特発性の流出路起源の単形性非持続性VTである場合が多く、予後との関連も不明である。さらに、EPSによるVF誘発は近年では予測因子としての意義が疑問視されている。以上よりわが国では欧米とは異なる治療基準が必要と考えられている。

このため、2007年12月に発表された日本循環器学会の診療ガイドライン²⁴では失神群、無症候群においてはVF誘発や失神をICD植込み条件を満たす単独の指標とはせず、失神、突然死家族歴、EPSでのVF誘発のうち2つ以上を満たす場合をクラスIIa、それ以外はIIbの適応としている。本ガイドラインは現時点でもっとも妥当な治

表 1 QT延長症候群(先天性・二次性)とBrugada症候群の診療に関するガイドラインにおけるBrugada症候群のICD植込み適応²⁵⁾

	Coved(Type 1)型(自然または薬物)						
失神	+	+	+	+	-	-	-
突然死家族歴	+	+	-	-	+	+	-
VF 誘発	+	-	+	-	+	-	+
クラス分類	II a	II a	II a	II b	II a	II b	II b

クラス I : 心停止・心蘇生例, 自然停止する VF/多形性 VT が確認されている例.

クラス II : Brugada 型心電図を有する例(薬物負荷, 1 肋間上の心電図記録も含む)で, 失神, 家族歴, VF 誘発のうち, 2 つ以上の指標があれば II a, 1 つだと II b とする.

療指針と思われるが, 一方で, 対象を Type 1 例に限定していることと, 失神例の取扱いや EPS の意義に関して若干議論の余地を残している(表 1).

2. 薬物治療

VF 多発時の薬物治療としてはイソプロテレノールの持続点滴が有用である. VF 予防の経口薬としては, これまでβ刺激薬や, Ito チャネル遮断作用のある薬物(キニジン, ペプリジルなど), Ca 電流を増加させるシロスタゾールが有効と報告されている. しかし, これらの薬剤は VF を完全に抑制するまでには至らないため, 無症候群の一次予防には用いられていない.

一方, Brugada 症候群で AF や冠攣縮性狭心症, 神経調節性失神を伴うことが少なくない. この際, Na チャネル遮断薬や Ca 拮抗薬, β遮断薬, 向精神薬などが使用される可能性があるが, これらの薬剤では心筋のイオン電流を変化させて, ST を上昇させることが報告されている. このすべてが Brugada 症候群例に VF を発生させるわけではないが, 治療の際にはその選択に十分な留意が必要となろう.

● Brugada症候群と早期再分極症候群

特発性 VF では V₁-V₃誘導での ST 上昇はないが, II, III, aVF 誘導または V₃-V₆誘導で J 波が存在~増高していたり saddleback 型に近い ST 上昇のみられる例が報告されていた. また, J 波増高と Brugada 型(coved)心電図の両方が異なった時期の異なった誘導部位で認められる例もあり, それらは, Brugada 症候群の亜型であるか, または VF の基質が Brugada 症候群とは異なる部位にあ

る可能性が示唆されていた. 近年, Haissaguerre らは V₁-V₃誘導を除く下側壁誘導(II, III, aVF, I, aVL, V₄-V₆)の 2 誘導以上で, 1 mm 以上の J 波(notch や slur を伴う)増高を有する早期再分極症候群の臨床像を報告した²⁵⁾. 本症候群では VF による突然死が生じるが, 約 30% の症例では病態・予後ともに Brugada 症候群に類似していることが指摘されている.

Haissaguerre らは対象から V₁-V₃誘導での Type 1 心電図例を除外しているため, 本症候群は Brugada 症候群とは異なる疾患とみなされる傾向にある. 一方で, J 波の原因は Brugada 症候群と同様な心室再分極異常と考えられている. しかし, 本症候群には非 Type 1 心電図を呈する Brugada 症候群が含まれている可能性を否定できない. 今後, Brugada 症候群との類似性を含めて真の早期再分極症候群の病態, および機序の解明が望まれる.

文献

- 1) Brugada, P. and Brugada, J. : *J. Am. Coll. Cardiol.*, **20** : 1391-1396, 1992.
- 2) Chen, Q. et al. : *Nature*, **392** : 293-296, 1998.
- 3) London, B. et al. : *Circulation*, **116** : 2260-2268, 2007.
- 4) Antzelevitch, C. et al. : *Circulation*, **115** : 442-449, 2007.
- 5) Watanabe, H. et al. : *J. Clin. Invest.*, **118** : 2260-2268, 2008.
- 6) Delpon, E. et al. : *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.*, **1** : 209-218, 2008.
- 7) Hu, D. et al. : *Circ. Cardiovasc. Genet.*, **2** : 270-278, 2009.
- 8) Bezzina, C.R. et al. : *Circulation*, **113** : 338-344, 2006.
- 9) Yan, G. X. and Antzelevitch, C. : *Circulation*, **100** :

1660-1666, 1999.

- 10) Aiba, T. et al. : *J. Am. Coll. Cardiol.*, **47** : 2074-2085, 2006.
- 11) Lambiase, P. D. et al. : *Circulation*, **120** : 106-117, 2009.
- 12) Nagase, S. et al. : *J. Am. Coll. Cardiol.*, **39** : 1992-1995, 2002.
- 13) Morita, H. et al. : *Circulation*, **118** : 1697-1704, 2008.
- 14) Coronel, R. et al. : *Circulation*, **112** : 2769-2777, 2005.
- 15) Brugada, J. et al. : *Circulation*, **105** : 73-78, 2002.
- 16) Priori, S. G. et al. : *Circulation*, **105** : 1342-1347, 2002.
- 17) Eckardt, L. et al. : *Circulation*, **111** : 257-263, 2005.
- 18) Antzelevitch, C. et al. : *Circulation*, **111** : 659-670, 2005.
- 19) Kamakura, S. et al. : *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.*, **2** : 495-503, 2009.
- 20) Takagi, M. et al. : *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*, **18** : 1244-1251, 2007.
- 21) Probst, V. et al. : *Circulation*, **121** : 635-643, 2010.
- 22) Brugada, J. et al. : *Circulation*, **108** : 3092-3096, 2003.
- 23) Epstein, A. E. et al. : *Circulation*, **117** : e350-e408, 2008.
- 24) 大江 透・他 : *Circulation Journal*, **71** (Suppl. IV) : 1205-1253, 2007.
- 25) Haissaguerre, M. et al. : *N. Engl. J. Med.*, **358** : 2016-2023, 2008.

* * *

Remission of Abnormal Conduction and Repolarization in the Right Ventricle After Chemotherapy in Patients With Anterior Mediastinal Tumor

AKASHI MIYAMOTO, M.D., HIDEKI HAYASHI, M.D., PH.D., MAKOTO ITO, M.D., PH.D.,
and MINORU HORIE, M.D., PH.D.

From the Department of Cardiovascular and Respiratory Medicine, Shiga University of Medical Science, Shiga, Japan

A 22-year-old man with no significant past medical history presented with dry cough that lasted for a couple of months. The patient denied accompanying shortness of breath, palpitation, edema, high fever, or syncope. He had no family history of sudden death. On examination, he was afebrile with a blood pressure of 106/63 mm Hg, pulse rate of 88 beats/min, and normal oxygen saturation. His heart sound was normal without a pericardial rub. ECG (Fig. 1A) displayed a terminal r wave (arrow a) and ST-segment elevation (arrow b) followed by negative deflection of T wave (arrow c) in lead V₁. Chest computed tomography (Fig. 1A) revealed the existence of demarcated tumor in the anterior mediastinal space that attached to the pericardium in front of the right atrium and ventricle. The tumor encompassed the right ventricular outflow tract (arrow) but did not show invasion into the intrapericardial space. The tumor was histologically diagnosed with the large B cell lymphoma from a specimen obtained by needle biopsy. He started to undergo chemotherapy including cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, rituximab, and prednisolone. Two months after the chemotherapy, chest computed tomography confirmed that the lymphoma size

was reduced, which was almost invisible (Fig. 1B). At that time, ECG showed the disappearance of a late r' wave and ST-segment elevation in lead V₁ (Fig. 1B). These findings indicate that coinciding with the shrinkage of anterior mediastinal tumor, conduction disturbance, and abnormal repolarization in the right ventricle were resolved. No life-threatening arrhythmic event occurred during the follow-up.

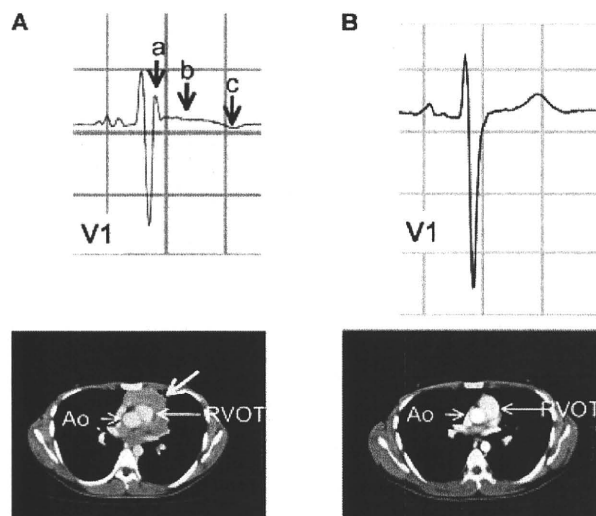


Figure 1. A and B: ECG recording in lead V₁ and contrast-enhanced computed tomography scan before and after chemotherapy, respectively. Ao = Aorta; RVOT = right ventricular outflow tract.

J Cardiovasc Electrophysiol, Vol. pp. 1-1.

No disclosures.

Address for correspondence: Hideki Hayashi, M.D., Ph.D., Department of Cardiovascular and Respiratory Medicine, Shiga University of Medical Science, Otsu, Shiga 520-2192, Japan. Fax: 81-77-543-5839; E-mail: hayashih@belle.shiga-med.ac.jp

doi: 10.1111/j.1540-8167.2010.01898.x

Reciprocal Control of hERG Stability by Hsp70 and Hsc70 With Implication for Restoration of LQT2 Mutant Stability

Peili Li, Haruaki Ninomiya, Yasutaka Kurata, Masaru Kato, Junichiro Miake, Yasutaka Yamamoto, Osamu Igawa, Akira Nakai, Katsumi Higaki, Futoshi Toyoda, Jie Wu, Minoru Horie, Hiroshi Matsuura, Akio Yoshida, Yasuaki Shirayoshi, Masayasu Hiraoka, Ichiro Hisatome

Rationale: The human ether-a-go-go-related gene (hERG) encodes the α subunit of the potassium current I_{Kr} . It is highly expressed in cardiomyocytes and its mutations cause long QT syndrome type 2. Heat shock protein (Hsp)70 is known to promote maturation of hERG. Hsp70 and heat shock cognate (Hsc70) 70 has been suggested to play a similar function. However, Hsc70 has recently been reported to counteract Hsp70.

Objective: We investigated whether Hsc70 counteracts Hsp70 in the control of wild-type and mutant hERG stability.

Methods and Results: Coexpression of Hsp70 with hERG in HEK293 cells suppressed hERG ubiquitination and increased the levels of both immature and mature forms of hERG. Immunocytochemistry revealed increased levels of hERG in the endoplasmic reticulum and on the cell surface. Electrophysiological studies showed increased I_{Kr} . All these effects of Hsp70 were abolished by Hsc70 coexpression. Heat shock treatment of HL-1 mouse cardiomyocytes induced endogenous Hsp70, switched mouse ERG associated with Hsc70 to Hsp70, increased I_{Kr} , and shortened action potential duration. Channels with disease-causing missense mutations in intracellular domains had a higher binding capacity to Hsc70 than wild-type channels and channels with mutations in the pore region. Knockdown of Hsc70 by small interfering RNA or heat shock prevented degradation of mutant hERG proteins with mutations in intracellular domains.

Conclusions: These results indicate reciprocal control of hERG stability by Hsp70 and Hsc70. Hsc70 is a potential target in the treatment of LQT2 resulting from missense hERG mutations. (*Circ Res.* 2011;108:458-468.)

Key Words: hERG ■ Hsp70 ■ Hsc70 ■ stabilization ■ long QT2

The human ether-a-go-go-related gene (hERG) encodes the α subunit of a rapidly activating delayed-rectifier K^+ current (I_{Kr}),¹⁻³ which controls the action potential duration in cardiomyocytes. Mutations in the gene cause long-QT syndrome type 2 (LQT2), a disorder that leads to life-threatening arrhythmia. To date, more than 200 naturally occurring mutations of hERG have been identified. Functional analysis of mutant proteins showed that most of them had an impairment of protein maturation and/or trafficking.⁴⁻⁶ They are recognized by the quality control machinery of the endoplasmic reticulum (ER), ubiquitinated, and eventually degraded by the proteasomal degradation system.⁶⁻⁸ The maturation of hERG can be evaluated by comparing the levels of the 2 forms of this protein; a core-glycosylated, immature form of 135-kDa localized in the ER, and a fully glycosylated mature

form of 155 kDa localized either in the Golgi apparatus or on cell surface.^{7,9}

Molecular chaperones participate in every step of hERG biogenesis, including synthesis, folding, assembly, and translocation.^{8,10,11} The heat shock protein (Hsp)70 family, including stress-induced Hsp70 and constitutively expressed heat shock cognate protein (Hsc)70, interact with the core-glycosylated form of hERG.^{8,12} Hsp70 increases the levels of both immature and mature forms of hERG,⁸ whereas the role of Hsc70 remains unknown. In other channel proteins, such as the murine epithelial sodium channel, Hsc70 has been shown to counteract the action of Hsp70 and, thus, decreases the level of the channel protein.¹³ The primary purpose of this study was to examine whether Hsc70 had a similar action on hERG. For this purpose, we investigated the effects of Hsp70 and Hsc70 on the level of

Original received July 6, 2010; revision received December 6, 2010; accepted December 13, 2010. In November 2010, the average time from submission to first decision for all original research papers submitted to *Circulation Research* was 13.2 days.

From the Department of Genetic Medicine and Regenerative Therapeutics (P.L., J.M., Y.Y., A.Y., Y.S., I.H.), Institute of Regenerative Medicine and Biofunction; Department of Biological Regulation (H.N.); Research Center for Bioscience and Technology (K.H.); Department of Cardiovascular Medicine (M.K., O.I.), Tottori University; Department of Physiology II (Y.K.), Kanazawa Medical University; Department of Biochemistry and Molecular Biology (A.N.), Yamaguchi University School of Medicine; Departments of Physiology (F.T., H.M.) and Cardiovascular Medicine (J.W., M. Horie) Shiga University of Medical Science; and Department of Cardiovascular Diseases, Tokyo Medical and Dental University (M. Hiraoka), Japan.

Correspondence to Ichiro Hisatome, Department of Genetic Medicine and Regenerative Therapeutics, 36-1, Nishimachi, Yonago, Tottori, 683-8503, Japan. E-mail hisatome@med.tottori-u.ac.jp

© 2011 American Heart Association, Inc.

Circulation Research is available at <http://circres.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.227835

Downloaded from circres.ahajournals.org at SHIGA UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCE on March 22, 2011

hERG proteins by biochemical and electrophysiological methods. Their effects were examined on exogenous hERG expressed in HEK293 cells as well as on endogenous proteins expressed in HL-1 cardiomyocytes. We also extended our study to examine an interaction of Hsc70 with mutant hERG proteins harboring disease-causing missense mutations.

Methods

An expanded Methods section is available in the Online Data Supplement at <http://circres.ahajournals.org>.

HEK293 cells were cultured in DMEM (Sigma) supplemented with 10% FBS (JRH) and penicillin/streptomycin/geneticin at 37°C, 5% CO₂.^{14–17} HL-1 mouse cardiomyocytes were maintained as previously described.¹⁸ An expression construct pcDNA3/hERG-FLAG was engineered by ligating an oligonucleotide encoding a FLAG epitope to the carboxy terminus of hERG cDNA. Missense mutations were introduced into pcDNA3/hERG-FLAG by site-directed mutagenesis. Transfection into HEK293 and HL-1 cells were performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) or Nucleofector technology (Amaxa Biosystems, Gaithersburg, MD), respectively, following the protocol of the manufacturer. pEGFP was added into all the experiments of transfection to trace the transfection efficiency. HEK293 cells stably expressing hERG-FLAG were transfected with pcDNA3/Hsc70 or Hsp70 together with pEGFP. Twenty-four hours after transfection, cells were visualized by EGFP fluorescence and hERG channel currents corresponding to I_{Kr} were measured at 37°C using whole-cell patch-clamp techniques. Procedures for the current measurement in HL-1 cells were essentially the same as described previously.¹⁹ The membrane potential was held at –50 mV to inactivate the T-type Ca²⁺ channel current ($I_{Ca,T}$) and avoid the hyperpolarization-activated cation current (I_p) activation,^{20,21} depolarized by 1-second test pulses (from –40 and +40 in 10-mV increments), then repolarized back to the holding potential; 0.4 μmol/L nisoldipine was included in the bath solution to block the L-type Ca²⁺ channel current ($I_{Ca,L}$).²⁰ Action potentials were also measured in the current-clamp mode, elicited at a rate of 0.5 Hz by 5-ms square current pulses of 1 nA, and sampled at 20 kHz in the absence or presence of 10 μmol/L E4031 (WAKO, Japan).

Results

Hsp70 and Hsc70 Exert Opposite Effects on the Maturation of hERG

We first examined effects of Hsp70 on hERG-FLAG expressed in HEK293 cells. As expected, hERG-FLAG gave 2 bands on the anti-FLAG immunoblot (IB), a fully glycosylated mature form of 155-kDa and an immature core-glycosylated form of 135-kDa (Figure 1A). Coexpression of Hsp70 increased the levels of both forms in a dose-dependent manner with a concomitant decrease in the ubiquitinated form of the protein. hERG was recovered in the detergent-soluble fraction, whether Hsp70 was expressed or not, suggesting that Hsp70 did not induce changes in protein solubility (Online Figure I, A). Hsp70 did not alter the level of hERG-FLAG mRNA (Online Figure I, B). Small interfering (si)RNAs targeted against Hsp70 caused marked decreases of both immature and mature forms of hERG-FLAG and also an increase in its ubiquitinated form (Figure 1B).

In contrast, coexpression of Hsc70 decreased the levels of both forms of hERG in a dose-dependent manner. The decreases were accompanied by an increase in its ubiquitinated form (Figure 1C). siRNAs targeted against Hsc70 caused a marked increase of both forms and also a decrease in its ubiquitinated form (Figure 1D). Hsc70 did not alter either solubility of hERG-FLAG or the level of its mRNA (Online Figure I, C and

Non-standard Abbreviations and Acronyms

APD	action potential duration
APD ₉₀	action potential duration at 90% repolarization
ER	endoplasmic reticulum
ERG	ether-a-go-go-related gene
hERG	human ether-a-go-go-related gene
HS	heat shock
Hsp70	heat shock protein 70
Hsc70	heat shock cognate protein 70
IB	immunoblot
I_{Kr}	rapidly activating delayed rectifier K ⁺ current
IP	immunoprecipitates
LQT2	long QT syndrome type 2
mERG	mouse ether-a-go-go-related gene
siRNA	small interfering RNA
WT	wild type

D). We then determined the half-life of hERG-FLAG by chase experiments (Figure 2). The half-life of the 135-kDa immature form was 9.5±3.1 hour in the control and was prolonged to 13±2.5 hours when cotransfected with Hsp70, whereas it was shortened to 6.8±2.3 hours by coexpression of Hsc70.

Next, we examined effects of Hsp70 and Hsc70 on intracellular localization of hERG-FLAG (Figure 3A). The immunoreactivity of hERG-FLAG was localized in the ER (nos. 1 to 3), the Golgi apparatus (nos. 4 to 6), and on the cell membrane (nos. 7 to 9), as evidenced by colocalization with calnexin, Golgi-GFP and GFP-Mem, respectively. Hsp70 appeared to increase the signals in all of these cellular components; and Hsc70 caused opposite effects. The changes in immunoreactivities were confirmed by a quantification analysis (Figure 3B).

The intracellular localization of hERG-FLAG was further confirmed by subcellular fractionation on the Optiprep gradient (Figure 3C). A membrane marker Na⁺/K⁺ ATPase was enriched in fractions 2 to 5, whereas an ER marker calnexin was enriched in nos. 10 to 15. Hsp70 increased the levels of hERG-FLAG in both fraction nos. 2 to 5 and nos. 11 to 16. Both Hsp70 and Hsc70 were enriched in fraction nos. 11 to 16, suggesting that the main site of action of these proteins was the ER.

To see whether Hsp70/Hsc70 affected the levels of functional hERG, we measured hERG channel currents in HEK293 cells stably expressing hERG-FLAG. Depolarizing pulses activated time-dependent outward currents corresponding to I_{Kr} (Figure 4A), and these currents were completely blocked by E4031 (10 μmol/L) as indicated by the disappearance of the tail currents (Online Figure II, A). The kinetics of the currents through hERG without the FLAG tag was nearly identical to those of the currents through hERG-FLAG, excluding an effect of the tag on hERG currents (Online Figure II, B). Hsp70 caused remarkable increases in both the peak and tail current amplitudes (Figure 4A through 4C). In contrast, Hsc70 reduced the peak currents during depolarization by approximately 49% and tail currents by approximately 58% (Figure 4A through 4C).

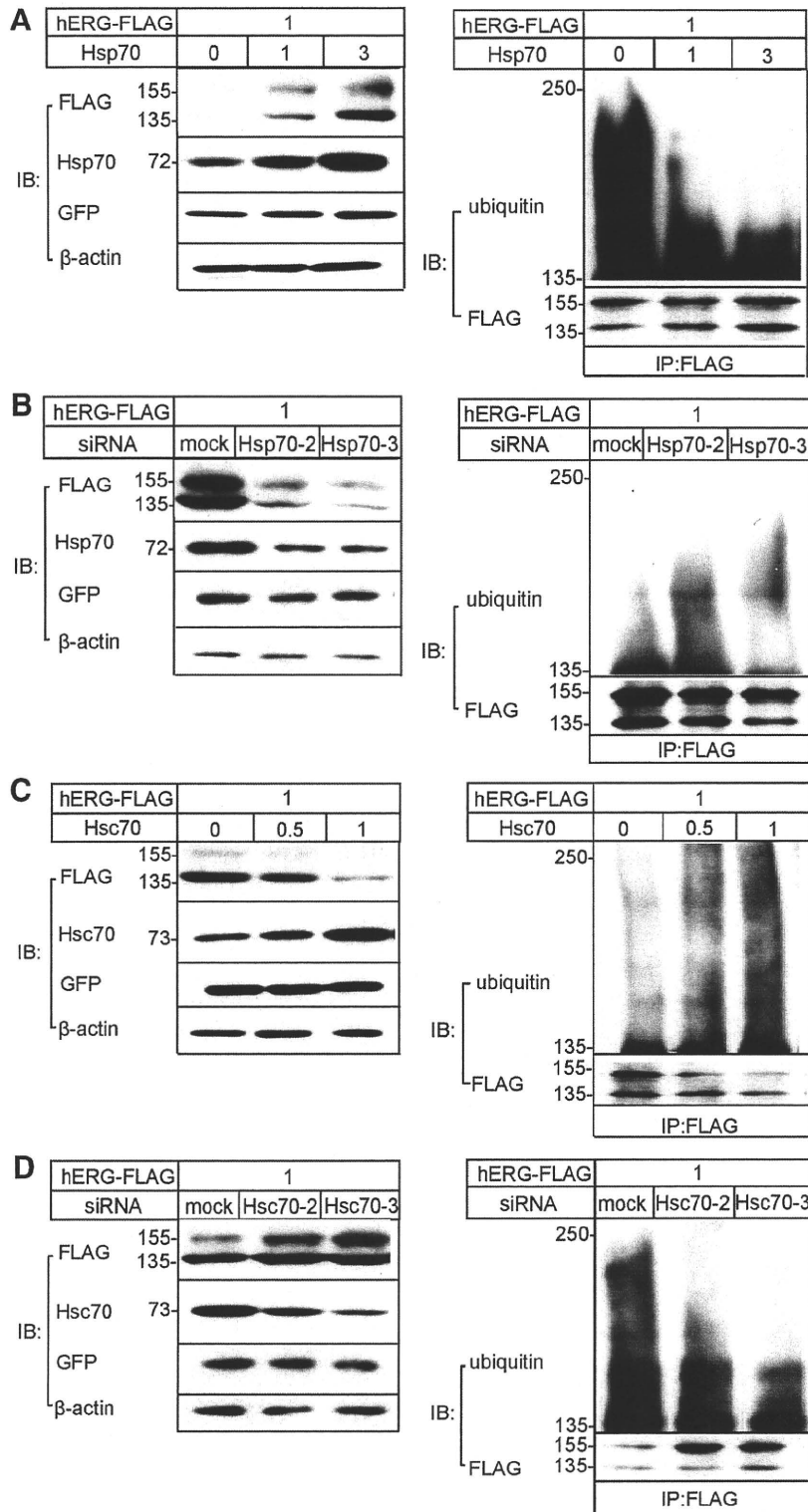


Figure 1. Effects of Hsp70 /Hsc70 on the levels of hERG-FLAG and its ubiquitination in HEK293 cells. Cells were transiently transfected with hERG-FLAG, pEGFP, and either Hsp70 (A) or Hsc70 (C). HEK293 cells transfected with hERG-FLAG constructs were treated with either a scramble siRNA (mock) or siRNA against Hsp70 (B) or Hsc70 (D) (n=5 to 9). The amounts of plasmids (μg) are indicated in each panel. Shown are representative blots. Cell extracts were subjected to IB with indicated antibodies (n=4 to 11) (left) or anti-FLAG immunoprecipitates (IP) were subjected to IB with anti-ubiquitin or FLAG antibody (n=5 to 7) (right).

Both Hsp70 and Hsc70 Associate With hERG-FLAG

To explore a biochemical basis for the opposite effects of Hsp70 and Hsc70, we examined their association with hERG by immunoprecipitation. The anti-FLAG immunoprecipitates (IPs) from hERG-expressing HEK293 cells contained endogenous Hsp70 and Hsc70 (Figure 5A). Both anti-Hsp70 and

anti-Hsc70 IPs contained the 135-kDa immature form of hERG, but not the 155-kDa mature form, suggesting selective association of these chaperones with the immature form (Figure 5B). The specificity of Hsp70 and Hsc70 antibodies was confirmed by Western blotting using Hsp70 or Hsc70 recombinant proteins (Online Figure III, A).

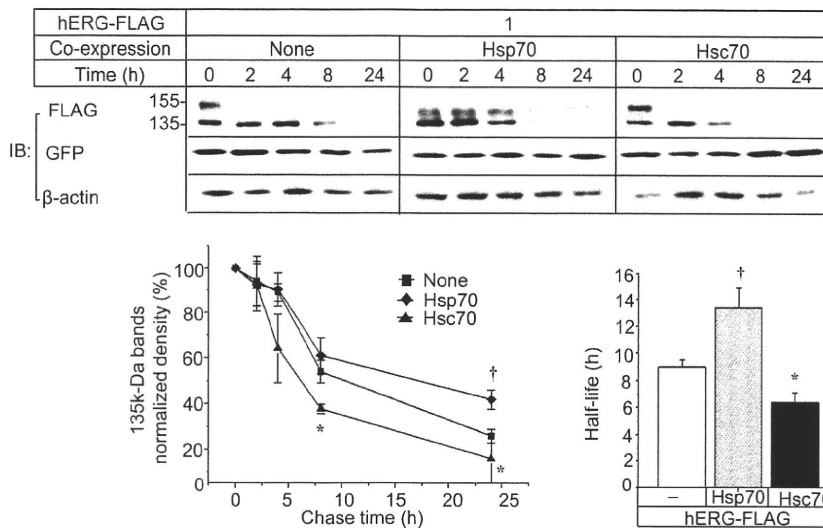


Figure 2. Degradation of hERG-FLAG proteins. HEK293 cells transiently expressing hERG-FLAG together with Hsp70 or Hsc70 were chased for the indicated time after addition of cycloheximide. Shown are the representative blot and time-dependent changes in the density of hERG-FLAG. The density of 135-kDa hERG-FLAG was normalized to the density at time 0 and β -actin. **Bar graph** shows half-life of hERG proteins. * $P < 0.05$, † $P < 0.01$ vs hERG-FLAG only (none) ($n = 6$ to 7).

Coexpression of Hsp70 increased the levels of hERG-FLAG recovered by anti-FLAG. Cotransfection of Hsc70 with Hsp70 diminished the increases of hERG-FLAG in a dose-dependent manner (Figure 5C). Accordingly, the level of Hsp70 in anti-FLAG IPs was reduced by Hsc70, and this reduction was accompanied by an increase in the level of Hsc70 in the IPs (Figure 5D). These data suggested that Hsp70 and Hsc70 compete with each other in an interaction with hERG.

Regulation of Endogenous Mouse ERG and Cardiac Action Potential Duration by Hsp70 and Hsc70

To evaluate the physiological roles of Hsp70 and Hsc70 in the stability control of endogenous mouse (m)ERG, we used HL-1 mouse cardiomyocytes. In these cells, the anti-mERG antibody recognized an intense band at 155-kDa and a faint band at 135-kDa (Figure 6A). Immunoprecipitation with the anti-mERG antibody revealed an association of this protein with both Hsp70 and Hsc70 (Online Figure III, B). Hsp70 but neither Hsp90 nor Hsc70 was induced by a heat shock (HS) treatment at 42°C for 1 hour (Figure 6A), indicating selective induction of Hsp70 by HS. This increase in Hsp70 was accompanied by an apparent increase in the levels of both 135-kDa immature and 155-kDa mature forms of mERG. Under control conditions, anti-mERG IPs contained only Hsc70. After the HS, the same IPs contained Hsp70. Thus, HS-induced increase in Hsp70 switched the chaperone associated with mERG from Hsc70 to Hsp70 (Figure 6B).

siRNAs against Hsp70 were introduced into cells treated with the HS, because of the low level of Hsp70 in HL-1 cells. The siRNAs obviously decreased the level of Hsp70. The levels of both forms of mERG were also decreased compared with the levels in cells given a scrambled siRNA (Figure 6C, left). In contrast, siRNAs against Hsc70 increased the level of the Hsp70-mERG complex (Figure 6C, right). Hsp70 or Hsc70 was expressed in HL-1 cells using nucleofactor with transfection efficiency up to 90%. Hsp70 increased both forms of mERG, whereas Hsc70 diminished them (Figure 6D).

We next recorded I_{Kr} as the E4031-sensitive current in control and HS-treated HL-1 cells. The possible contamina-

tion of other voltage-dependent currents was minimized by adding 0.4 μ M nisoldipine to bath solution to block $I_{Ca,L}$ and by setting a holding potential at -50 mV to inactivate $I_{Ca,T}$ and to prevent activation of I_r .^{20,21} Figure 7A shows whole-cell membrane currents recorded in HL-1. Depolarizing pulses activated time-dependent outward currents which increased with depolarization up to 0 mV (Control, None). The application of E4031 (10 μ M) almost completely abolished the time-dependent outward current and the tail current (Control, E4031). E4031-sensitive current traces were obtained by digitally subtracting the current traces in the presence of E4031 from the traces in the absence of E4031. The E4031-sensitive and -free currents have similar characteristics and current-voltage relationship, reflecting that I_{Kr} is the most prominent outward current in HL-1 cells. HS caused significant increases in both I_{Kr} peak and tail currents (Figure 7A and 7B).

Because the mERG current is responsible for repolarization of the cardiac action potential and I_{Kr} is the dominant outward current in HL-1 cells,^{18,22} we examined whether HS altered action potential duration (APD) in HL-1 cells. As shown in Figure 7C (a), the HS shortened APD at 90% repolarization (APD₉₀) without affecting resting membrane potentials. The APD₉₀ values in control and under HS treatment were 147.6 ± 5.6 and 63.0 ± 5.1 ms, respectively (Figure 7C, e). In accordance with these results, Hsp70 siRNA prolonged APD₉₀ as E4031 treatment, whereas Hsc70 siRNA shortened APD₉₀, regardless of the HS treatment (Figure 7C, b through d). Figure 7C (e) summarizes APD₉₀ values.

Because E4031 is a specific blocker of I_{Kr} , comparing the APD₉₀ to that with and without E4031 treatment (the ratio of APD₉₀ E4031/APD₉₀ control) clarifies the contribution of I_{Kr} to APD₉₀. As shown in Online Figure IV, HS treatment significantly increased the ratio of APD₉₀ E4031/APD₉₀ compared to that of control, whereas its effect was abolished by siRNA Hsp70. This indicated that HS-induced shortening of APD₉₀ was attributable to an increase of I_{Kr} via activation of Hsp70. Interestingly, siRNA against Hsc70 also significantly increased the ratio of APD₉₀ E4031/APD₉₀ control, suggesting that APD₉₀ may normally be under Hsc70 control.

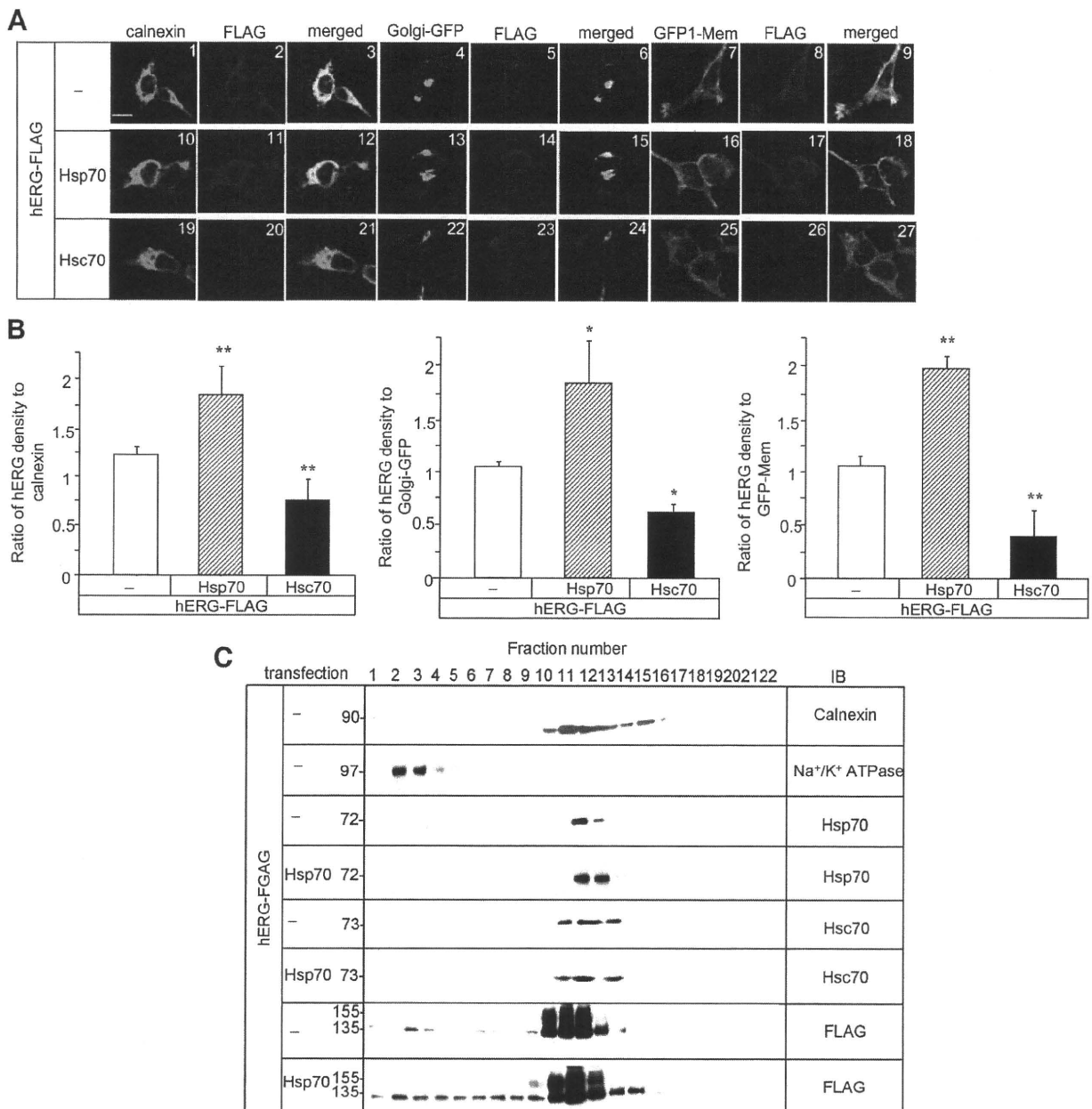


Figure 3. Intracellular localization of hERG-FLAG. **A**, Immunofluorescence of hERG-FLAG in HEK293 cells. Cells were transfected with hERG-FLAG together with pcDNA3 or Hsp70 or Hsc70 expression constructs. Parts of the cells were cotransfected with pAcGFP-Mem or Golgi-GFP. One set of cells was immunostained by calnexin (green). All the cells were stained with anti-FLAG and Alexa Fluor 546-conjugated secondary antibody (red). Shown are representative images obtained by a confocal microscope. **Bar**, 20 μ m. **B**, Quantification of anti-FLAG immunoreactivity. Shown is the ratio of intensity for Alexa 546/calnexin, Golgi-GFP, or pAcGFP-Mem fluorescence. Each column represents the mean \pm SEM of 12 to 15 determinations. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs mock (none) ($n = 12$ to 15). **C**, Cell fractionation. Whole-cell homogenates were prepared from HEK293 cells transiently expressing hERG-FLAG or with Hsp70 after 48 hours of transfection. The postnuclear supernatants were fractionated by a linear gradient of iodixanol. hERG-FLAG protein and various organelle markers were detected by IB analyses.

Stability Control of hERG Mutant Proteins by Hsp70 and Hsc70

Because mutations of hERG impair their stability, we examined binding activities of mutant hERG to Hsp70 and Hsc70. For this purpose, we engineered 10 kinds of mutant hERG proteins. The location of each missense mutation is depicted in Figure 8A (top). Figure 8A (bottom) shows representative IBs of cell lysates from HEK293 cells expressing either wild-type (WT) or various mutant hERG-FLAG. All of the mutant hERG gave only

the 135-kDa band. IP experiments showed that the mutants with mutations in intracellular domains preferentially associated with Hsc70; whereas those with mutations in the pore-region preferentially associated with Hsp70.

We then examined degradation of 2 kinds of mutant proteins, P596R, a mutation located in the pore-region, and F805C, an intracellular domain mutation. Chase experiments showed that F805C and P596R had half-life of 4.3 ± 1.5 hours and 7.4 ± 3.7 hours ($n = 5$ to 7, $P < 0.05$), respectively. Hsc70