

遺伝性不整脈の臨床診断、臨床研究

研究分担者 森田 宏 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 先端循環器治療学講座、准教授

研究要旨 遺伝性不整脈の一つである Brugada 症候群での不整脈発生のリスク評価を行い、症状、QRS の異常、早期再分極、ST 自然変動が致死的不整脈発生の独立した危険因子であった。これらの指標を用い、リスク評価の層別化が可能と考えられた。

A. 研究目的

遺伝性不整脈の多くは最初に心電図で診断されることが多いが、実際に致死的不整脈を発症するかどうかは後天的要因も関与するため、リスク評価を正確に行い、治療介入を行うかを決定する必要がある。

B. 研究方法

当院通院中の遺伝性不整脈疾患を有する患者（QT 延長症候群、Brugada 症候群、J 波 症候群など）に対して、日常診療で一般に行われる検査の組み合わせで、致死的不整脈の発生予測が出来るかどうかを検討。

（倫理面への配慮）侵襲的な検査は十分なインフォームドコンセントを行い、遺伝子検査は当院倫理委員会承諾を得て行っている

C. 研究結果

Brugada 症候群患者 321 例での検討では、致死的不整脈発生の予測因子として、症状（ハザード比 HR 10.5 倍）、多棘性 QRS（HR 2.7 倍）、下側壁誘導早期再分極（HR 3.0 倍）、0.2mV 以上の ST 自然変動（HR 10.7 倍）の項目が独立した危険因子であった。

D. 考察

十二誘導心電図で得られた新しい心電図指標である、多棘性 QRS 波形や ST 変動などが電気生理学的に不安定な状態や心筋障害などの器質的変化を示し、Brugada 症候群での致死的不整脈発生を予測できる

と考えられた。これらの指標の組み合わせで、効率よく不整脈発生の予測を行える可能性が考えられた。

E. 結論

多棘性 QRS、早期再分極、ST 自然変動の指標を複数有するものでは、致死的不整脈発生が高率であった。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表
別紙参照
2. 学会発表
 - 1) 森田 宏：第 27 回日本不整脈学会学術大会 2012 年 7 月
 - 2) Morita H, et al. 33rd Annual Scientific Session of Heart Rhythm Society, Boston, 2012

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

ヒト iPS 細胞由来分化心筋細胞に関する長期培養による成熟化の検討

分担研究者 牧山 武 京都大学大学院医学研究科循環器内科学 助教

研究要旨 ヒト人工多能性幹 (induced pluripotent stem: iPS) 細胞は、移植治療、疾患の病態解明への有用性が期待され、現在、非常に盛んな研究が行われている。ヒト iPS 細胞由来分化心筋は、成人心筋に比べ未熟であることが研究応用への妨げとなっており、今回、我々は、1 年までの長期接着培養における組織学的、遺伝子発現の成熟化を検討した。電子顕微鏡を用いた解析では、経時的にサルコメアの緻密化、A、H、I 帯の形成を認めたが、成熟心筋にみられる M 帯に関しては、1 年にてようやく一部の心筋に認めるのみであった。M 帯関連蛋白は、ヒト成人心筋に比べて遺伝子発現が低く、組織学的所見と合致した。本研究では、初めて M 帯を形成した iPS 細胞由来分化心筋を認めたが、成熟化は緩徐で、不完全であり、より効率的な成熟化法の開発が必要であると考えられた。

A. 研究目的

ヒト人工多能性幹 (induced pluripotent stem: iPS) 細胞は、移植治療、疾患の病態解明への有用性が期待され、現在、非常に盛んな研究が行われている。心疾患に関する方用に関しては、成人心筋に比べ未熟であることが研究応用への妨げとなっており、今回、我々は、1 年までの長期接着培養における組織学的、遺伝子発現の成熟化を検討した。

B. 研究方法

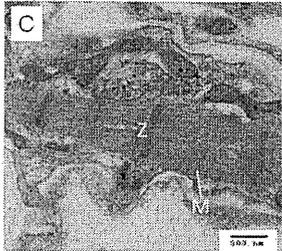
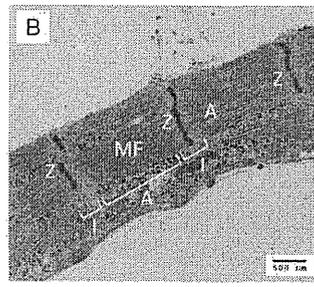
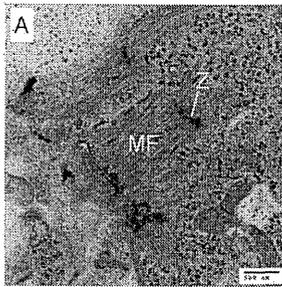
健康人皮膚より樹立した線維芽細胞に、山中 4 因子 (OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC 遺伝子) をレトロウイルスにて導入し作製された iPS 細胞株 (201B7) を用いた。胚様体形成法 (Yang et al. Nature 2008) を用いて心筋分化し、14、30、60、90、180、360 日の分化心筋の解析を行った。(接着培養) 電子顕微鏡、免疫染色を用いた組織学的解析、定量的 RNA 解析を用いた遺伝子発現解析を行った。

C. 研究結果

ヒト iPS 細胞は、心筋分化開始後、day 8 より自己拍動を開始し、day 360 まで胚様体は自己拍動を続

けたが、拍動数の減少を認めた。(day 30, 73.2 ± 34.9 bpm, $n=41$ vs. day 360, 32.2 ± 14.2 bpm, $n=42$, $p < 0.0001$) 酵素処理にてばらした単一心筋細胞の細胞面積は増加していた。(day 30, $3277.4 \pm 1679.5 \mu\text{m}^2$ vs. day 360, $4067.9 \pm 1814.6 \mu\text{m}^2$, $p=0.01$) 自己拍動のある胚様体における心筋細胞の割合を検討するため、microdissection 後、酵素処理を行い、免疫染色を行った。心筋トロポニン I 陽性の心筋細胞を、day 30, 61% ($n=213$), day 360, 64% ($n=191$) 認め、他に、 β III-tubulin 陽性の線維芽細胞、 α -SMA 陽性の神経細胞を認めた。また、day 360 では、MLC2v 陽性、MLC2a 陰性細胞が 36% から 60% に増加し、心室筋への成熟化傾向を示した。電子顕微鏡を用いた組織学的解析では、day 14 では、サルコメアが粗であるが、day 30 以降密になり、A、I 帯の出現を認めた。day 60 から day 90 にて、H 帯が出現し、day 360 にてようやく一部の心筋にて M 帯を認めた。(図)

遺伝子発現の解析では、M 帯関連蛋白 (LRRC39, MYOM1, MYOM2) は、成人心筋に比べて低下し、経時的増加も少なく、電子顕微鏡によるサルコメアの成熟化の遅延に合致する結果であった。



分化心筋の電顕像

A: Day 14, B: Day 30, C: Day 360

Z: Z band, A: A band, I: I band,
M: M band, MF: myofibrils

D. 考察

本研究は、ヒト iPS 細胞由来分化心筋の長期接着培養における成熟過程を明らかにした。day 30 と day 360 の比較にて、細胞面積の増加や拍動数の低下を認め成熟化の進行と考えられた。遺伝子発現でも、MLC2v 陽性、MLC2a 陰性細胞数が増加し、成熟化傾向を示した。day 360 にてようやく M 帯のある心筋細胞を認めたが、割合は数%と少なく、緩徐な成熟過程であると考えられた。要因としては、ヒト成人心にある液性因子、機械的ストレスなどの欠除が要因と推察された。

本研究の limitation として、micro dissection で胚様体を切りとり RNA 定量を行ったが、胚様体には非心筋細胞も含まれている。心筋トロポニン I 陽性の心筋細胞が、約 60%であった。但し、microdissection 後、3 日間培養後に解析しており、その間に非心筋細胞は増加することを考慮すると実際の割合はそれより高いと考えられた。

E. 結論

幹細胞由来分化心筋の未熟さは以前より指摘されているが、本研究では、長期培養にて初めて M 帯を形成した iPS 細胞由来分化心筋を認めた。但し、成熟化は緩徐で不完全であり、より効率的な成熟化法の開発が必要であると考えられた。

(本研究は Kamakura T, Makiyama T et al. *Circ J* 2013 に発表)

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Kamakura T, Makiyama T, Sasaki K, Yoshida Y, Wuriyanghai Y, Chen J, Hattori T, Ohno S, Kita T, Horie M, Yamanaka S, Kimura T. Ultrastructural Maturation of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in a Long-Term Culture.. *Circ J*. 2013 Feb 9.
- ② Villafañe J, Atallah J, Gollob MH, Maury P, Wolpert C, Gebauer R, Watanabe H, Horie M, Anttonen O, Kannankeril P, Faulkner B, Bleiz J, Makiyama T, Shimizu W, Hamilton R, Young ML. Long-Term Follow-Up of a Pediatric Cohort With Short QT Syndrome.. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Jan 25.
- ③ Ishikawa T, Takahashi N, Ohno S, Sakurada H, Nakamura K, On YK, Park JE, Makiyama T, Horie M, Arimura T, Makita N, Kimura A. Novel SCN3B Mutation Associated With Brugada Syndrome Affects Intracellular Trafficking and Function of Nav1.5. *Circ J*. 2012 Dec 21.
- ④ Hattori T, Makiyama T, Akao M, Ehara E, Ohno S, Iguchi M, Nishio Y, Sasaki K, Itoh H, Yokode M, Kita T, Horie M, Kimura T. A novel gain-of-function KCNJ2 mutation associated with short QT syndrome impairs inward rectification of Kir2.1 currents. *Cardiovasc Res*. 2012 Mar 15;93(4):666-73.
- ⑤ Kimura H, Zhou J, Kawamura M, Itoh H, Mizusawa Y, Ding WG, Wu J, Ohno S, Makiyama T, Miyamoto A, Naiki N, Wang Q, Xie Y, Suzuki T, Tateno S, Nakamura Y, Zang WJ, Ito M, Matsuura H, Horie M. Phenotype variability in patients carrying KCNJ2 mutations. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012 Jun;5(3):344-53.
- ⑥ Watanabe H, Nogami A, Ohkubo K, Kawata H, Hayashi Y, Ishikawa T, Makiyama T, Nagao S, Yagihara N, Takehara N, Kawamura Y, Sato A, Okamura K, Hosaka Y, Sato M, Fukae S,

Chinushi M, Oda H, Okabe M, Kimura A, Maemura K, Watanabe I, Kamakura S, Horie M, Aizawa Y, Shimizu W, Makita N. Clinical characteristics and risk of arrhythmia recurrences in patients with idiopathic ventricular fibrillation associated with early repolarization. *Int J Cardiol.* 2012 Sep 6;159(3):238-40.

2. 学会発表

- ① 牧山 武: Phenotypic characteristics between SCN5A and LMNA mutation carriers in familial bradyarrhythmic disorders. The 5th Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHRS) Scientific Session, Taipei, Taiwan, 10.3-6, 2012.
- ② 牧山武: Disease Modeling in Human Induced Pluripotent Stem Cells -Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia-, 第77回日本循環器学会学術集会, 横浜, 3.15-17, 2013.
- ③ 鎌倉 令: One-year assessment of the ultrastructural changes of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, European Society of Cardiology (ESC) Congress, Munich, Germany, 8.25-29, 2012.
- ④ 鎌倉 令: Genetic Backgrounds in Patients with Early-Onset and Familial Atrial Fibrillation, The 5th Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHRS) Scientific Session, Taipei, Taiwan, 10.3-6, 2012.
- ⑤ 佐々木 健一: One Year Assessment of Ion Channel Gene Expression in Cardiomyocytes derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells, The 5th Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHRS) Scientific Session, Taipei, Taiwan, 10.3-6, 2012.
- ⑥ 佐々木 健一: O Ca²⁺ Imaging of Cardiomyocytes Differentiated from Human Induced Pluripotent Stem Cells in Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia, 第77回日本循環器学会学術集会, 横浜, 3.15-17, 2013.
- ⑦ 佐々木 健一: One Year Assessment of Ion Channel Gene Expression

in Cardiomyocytes derived from

Human Induced Pluripotent Stem Cells, 第77回日本循環器学会学術集会, 横浜, 3.15-17, 2013.

- ⑧ Yimin Wuriyanghai: Identification of Cardiomyocytes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells using a Cardiac Specific Lentiviral Vector, 第77回日本循環器学会学術集会, 横浜, 3.15-17, 2013.

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

早期再分極症候群の臨床像と遺伝的背景に関する研究

研究分担者 渡部 裕 新潟大学大学院医歯学総合病院 循環器内科 助教

研究要旨

近年、早期再分極症候群という新しい疾患概念が提唱されたが、その臨床像や遺伝的背景に関する知見は十分ではない。そこで、国内の複数の共同研究施設より早期再分極症候群の症例を集積し臨床像の解明と心室細動発作の危険因子の検索を行った。早期再分極症候群において、若年発症、突然死の家族歴並びにElectrical Stormの既往が心室細動発作の危険因子であることを解明した。これらの危険因子を持つ症例では、より嚴重な心室細動発作と突然死の要望が必要であることが示唆された。

A. 研究目的

近年、心電図の早期再分極が特発性心室細動に關与するという早期再分極症候群という新しい疾患概念が提唱されたが、その臨床像や遺伝的背景に関する知見は十分ではない。

B. 研究方法

国内の複数の共同研究施設より早期再分極症候群の症例を集積し、臨床像を検討し心室細動発作の危険因子の検索を行った。

（倫理面への配慮）

各施設の倫理委員会の承認を得た上でデータは不可逆的匿名化した上で、解析に用いた。

C. 研究結果

53例の早期再分極症候群の症例のうち、突然死の家族歴があるものは13%であり、Electrical Stormを17例で認めた。また4例ではSCN5A遺伝子の変異が同定された。多変量解析にて、様々な臨床像や遺伝的背景のうち、若年発症、突然死の家族歴とElectrical Stormの既往が心室細動発作の危険因子であった。

D. 考察

早期再分極症候群における心室細動発作の新たな危険因子を同定した。これらの危険因子を持つ症例では、より嚴重な心室細動発作と突然死の要望が必要であることが示唆された。

E. 結論

早期再分極症候群において、若年発症、突然死の家族歴並びにElectrical Stormの既往が心室細動発作の危険因子であった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Watanabe H, Yagihara N, Aizawa Y, Kodama M, Tanabe N, Watanabe T. The cholesterol paradox in atrial fibrillation.

Circ J. 2012;76:1538

2. Watanabe H, Ohkubo K, Watanabe I, Matsuyama TA, Ishibashi-Ueda H, Yagihara N, Shimizu W, Horie M, Minamino T, Makita N. Scn5a mutation associated with ventricular fibrillation, early repolarization, and concealed myocardial abnormalities. *Int J Cardiol.* 2012
3. Watanabe H, Nogami A, Ohkubo K, Kawata H, Hayashi Y, Ishikawa T, Makiyama T, Nagao S, Yagihara N, Takehara N, Kawamura Y, Sato A, Okamura K, Hosaka Y, Sato M, Fukae S, Chinushi M, Oda H, Okabe M, Kimura A, Maemura K, Watanabe I, Kamakura S, Horie M, Aizawa Y, Shimizu W, Makita N. Clinical characteristics and risk of arrhythmia recurrences in patients with idiopathic ventricular fibrillation associated with early repolarization. *Int J Cardiol.* 2012;159:238-240
4. Watanabe H, Nogami A, Ohkubo K, Kawata H, Hayashi Y, Ishikawa T, Makiyama T, Nagao S, Yagihara N, Takehara N, Kawamura Y, Sato A, Okamura K, Hosaka Y, Sato M, Fukae S, Chinushi M, Oda H, Okabe M, Kimura A, Maemura K, Watanabe I, Kamakura S, Horie M, Aizawa Y, Shimizu W, Makita N. Response to letter regarding article, "electrocardiographic characteristics and

- scn5a mutations in idiopathic ventricular fibrillation associated with early repolarization". *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2012;Accepted:e60-e61
5. Watanabe H, Makita N, Tanabe N, Watanabe T, Aizawa Y. Electrocardiographic abnormalities and risk of complete atrioventricular block. *Int J Cardiol.* 2012;155:462-464
 6. Watanabe H, Aizawa Y. Letter by watanabe and aizawa regarding article, "blood lipid levels, lipid-lowering medications, and the incidence of atrial fibrillation: The atherosclerosis risk in communities (aric) study". *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2012;5:e80
 7. Sato A, Chinushi M, Suzuki H, Numano F, Hanyu T, Iijima K, Watanabe H, Furushima H. Long qt syndrome with nocturnal cardiac events caused by a *kcnh2* missense mutation (g604s). *Intern Med.* 2012;51:1857-1860
 8. Makita N, Seki A, Sumitomo N, Chkourko H, Fukuhara S, Watanabe H, Shimizu W, Bezzina CR, Hasdemir C, Mugishima H, Makiyama T, Baruteau A, Baron E, Horie M, Hagiwara N, Wilde AA, Probst V, Le Marec H, Roden DM, Mochizuki N, Schott JJ, Delmar M. A connexin40 mutation associated with a malignant variant of progressive familial heart block type i. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2012;5:163-172
 9. Hasegawa K, Sato A, Watanabe H, Furushima H, Chinushi M, Aizawa Y. Early repolarization and its modification by preexcitation in two patients with intermittent wolff-parkinson-white syndrome. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2012
 10. Furushima H, Chinushi M, Iijima K, Hasegawa K, Sato A, Izumi D, Watanabe H, Aizawa Y. Is the coexistence of sustained st-segment elevation and abnormal q waves a risk factor for electrical storm in implanted cardioverter defibrillator patients with structural heart diseases? *Europace.* 2012;14:675-681
 11. Chinushi M, Sato A, Iijima K, Suzuki K, Hiroshi F, Izumi D, Watanabe H, Kanae H, Aizawa Y. Exercise-related qt interval shortening with a peaked t wave in a healthy boy with a family history of sudden cardiac death. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2012
 12. Aizawa Y, Sato A, Watanabe H, Chinushi M, Furushima H, Horie M, Kaneko Y, Imaizumi T, Okubo K, Watanabe I, Shinozaki T, Fukuda K, Joo K, Haissaguerre M. Dynamicity of the j-wave in idiopathic ventricular fibrillation with a special reference to pause-dependent augmentation of the j-wave. *J Am Coll Cardiol.* 2012;59:1948-1953
2. 学会発表
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
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

分子遺伝学的手法による心房細動発症機構の解明に関する研究

研究分担者 林 研至 金沢大学大学院医薬保健研究域医学系 循環器内科 助教

孤立性心房細動症例の15%に家族歴が認められるとされ、2003年にKCNQ1遺伝子変異による家族性心房細動が報告されて以来、さまざまな遺伝子異常が報告されている。本研究では、孤立性心房細動症例に対して遺伝子解析および機能解析を行い、遺伝子異常の意義を明らかにすることを目的とした。孤立性心房細動患者72例（男性53例、平均発症年齢46±11歳）を対象とし、*KCNQ1*, *KCNH2*, *KCNE2*, *KCNA5*, *KCNJ2*, *SCN5A*, *SCN1B*, *SCN2B*, *SCN3B*, *GJA5*, *NPPA*各遺伝子について遺伝子解析を行った。イオンチャネル遺伝子に変異が認められた場合、CHO細胞もしくはHEK293細胞に変異チャネルを発現させ、パッチクランプ法にて電気生理学的特徴を検討した。17例（24%）に心房細動の家族歴が認められ、8例に徐脈性不整脈、3例にBrugada症候群の合併が認められた。遺伝子解析の結果、2種類の*KCNH2*変異（T436M, T895M）と2種類の*KCNA5*変異（H463R, T527M）を同定した。また、2種類の新しい遺伝子多型（*SCN5A* R986Q, *SCN1B* T189M）と、心房細動発症と関わりがあると報告のある4種類の遺伝子多型（*KCNH2* K897T, *KCNE1* S38G, *SCN5A* H558R, *SCN5A* R1193Q）を同定した。21例にこれらの遺伝子変異もしくは多型が認められた。電気生理学的検討で、*KCNH2* T436M, T895Mおよび*SCN1B* T189Mは機能獲得異常と考えられ、*KCNA5* H463Rおよび*SCN5A* R986Qは機能喪失異常と考えられた。孤立性心房細動症例において機能異常を伴う心筋イオンチャネルの5つの遺伝子異常が認められ、これらは心房細動発症に関与している可能性があると考えられた。

A. 研究目的

孤立性心房細動症例に対して遺伝子解析および機能解析を行い、遺伝子異常の意義を明らかにすることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

孤立性心房細動患者（高血圧、明らかな器質的心疾患、甲状腺機能異常を認めない65歳未満の症例）72例（男性53例、平均発症年齢46±11歳）を対象とした。患者の末梢白血球よりゲノムDNAを抽出し、*KCNQ1*, *KCNH2*, *KCNE2*, *KCNA5*, *KCNJ2*, *SCN5A*, *SCN1B*, *SCN2B*, *SCN3B*, *GJA5*, *NPPA*のexon領域についてPCR法を用いて増幅した。Hi-Res Melting法を用いて遺伝子スクリーニングを行い、異常パターンを認めたサンプルについては、オートシーケンサーを用いて塩基配列異常を決定した。同定した遺伝子変異の機能解析を行うため、部位特定突然変異導入法を用いて変異cDNAを作成し、変異チャネルをCHO細胞またはHEK293細胞に発現させ、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）

遺伝子解析については、金沢大学医薬保健研究域等 ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会に

課題名「不整脈関連遺伝子の解析」を申請し、承認を得た。研究実施に関与しない個人識別管理者が厳重に管理し、遺伝子解析研究者にどの患者の試料であるかがわからない状態で研究を進めた。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

孤立性心房細動患者72例中17例（24%）に心房細動の家族歴が認められた。22例が慢性心房細動であり、8例に徐脈性不整脈、3例にBrugada症候群の合併が認められた。遺伝子解析の結果、2種類の*KCNH2*変異（T436M, T895M）と2種類の*KCNA5*変異（H463R, T527M）を同定した。また、2種類の新しい遺伝子多型（1例に*SCN5A* R986Qおよび2例に*SCN1B* T189M）と、心房細動発症と関わりがあると報告のある4種類の遺伝子多型（4例に*KCNH2* K897T, 7例に*KCNE1* S38G, 2例に*SCN5A* H558R, 7例に*SCN5A* R1193Q）を同定した。72例中21例（29%）にこれらの遺伝子変異もしくは多型が認められた。*KCNH2* T436M変異は38歳に発症し慢性心房細動の62歳男性に認められ、心房細動の家族歴が認められた。*KCNH2* T895M変異は40歳より

動悸を自覚し発作性心房細動の59歳男性に認められ、心房細動の家族歴が認められた。*KCNA5* H463R変異は51歳より動悸を自覚し発作性心房細動の62歳女性で同定された。*KCNA5* T527M変異は49歳に発症し発作性心房細動と洞不全症候群の56歳男性で同定され、*KCNA5*変異の他に*KCNH2* K897T多型と*SCN5A* R1193Qが認められた。*KCNH2* T895M変異および*KCNA5* H463R変異の発端者において心房細動に対するカテーテルアブレーションが施行された。また、*KCNA5* T527M変異の発端者において、洞不全症候群に対してペースメーカー植込み術が施行された。パッチクランプ法による電気生理学的検討で、*KCNH2* T436M、T895Mおよび*SCN1B* T189Mのそれぞれの発現電流は野生型と比べて有意に大であり、これらの変異は機能獲得異常と考えられた。*KCNA5* H463Rは野生型*KCNA5* に対してdominant-negative suppressionを示し発現電流の著しい低下が認められ、*SCN5A* R986Qの発現電流は野生型と比べて有意に小であり、これらの変異は機能喪失異常と考えられた。

D. 考察

心房細動の家族歴のある17例のうち13例で遺伝子変異および多型が認められず、本研究で解析した遺伝子以外の遺伝子異常が原因である可能性があり、次世代シーケンサーなどによる検討が必要と考えられた。

E. 結論

孤立性心房細動症例において機能異常を伴う5つの心筋イオンチャネルの遺伝子異常が認められ、これらは心房細動発症に関与している可能性があると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

●Liu L, Hayashi K, Kaneda T, Ino H, Fujino N, Uchiyama K, Konno T, Tsuda T, Kawashiri MA, Ueda K, Higashikata T, Shuai W, Kupersmidt S, Higashida H, Yamagishi M. A novel mutation in the transmembrane nonpore region of the *KCNH2* gene causes severe clinical manifestations of long QT syndrome. *Heart Rhythm*. 2013 Jan;10(1):61-7.

2. 学会発表

●The 27th Annual Meeting of the Japanese Heart Rhythm Society / Symposium II, 遺伝性不整脈の臨床 from bench to bedside / 孤立性心房細動に認められる遺伝子異常とその意義 / 林 研至, 津田豊暢, 井野秀一, 谷 賢之, 劉 莉, 藤野 陽, 今野哲雄, 川尻剛照*, 倉田康孝, 東田陽博, 山岸正和

● American Heart Association SCIENTIFIC SESSIONS 2012 / Functional Characterization of Cardiac Ion Channel Gene Variants in Lone Atrial Fibrillation / Kenshi Hayashi, Satoyuki Tani, Li Liu, Hidekazu Ino, Noboru Fujino, Tetsuo Konno, Akihiko Hodatsu, Toyonobu Tsuda, Akihiro Inazu, Haruhiro Higashida, Masa-aki Kawashiri, and Masakazu Yamagishi / Nov. 3-7, 2012, Los Angeles, CA

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

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

早期再分極症候群と Brugada 症候群の病態と長期予後に関する研究

研究分担者 鎌倉 史郎 国立循環器病研究センター 中央診療部門長（内科系）

研究要旨 心室細動を伴う早期再分極症候群と Brugada 症候群を全国規模で登録し、種々の検査を施行して、両症候群の病態と長期予後を検討した。この1年間で計130例を登録でき、その経過観察では両症候群とも、同等で不良な予後を呈していた。早期再分極症候群の後ろ向き検討では、本症候群が全く異なった2つの病態から構成されている可能性が示唆され、前壁誘導のJ波の存在が予後を決定していると考えられた。Brugada 症候群の検討では、電気生理学検査での2連発以下での早期期外刺激による心室性不整脈誘発が、全 Brugada 症候群のみならず、失神群、無症候群の不良な予後予測に有用であると考えられた。

A. 研究目的

Brugada 症候群は、V1-V3 誘導の特異な ST 上昇を特徴とし、青壮年男性が夜間に心室細動(VF)のために突然死する疾患である。一方、早期再分極(early repolarization)症候群は、下側壁誘導におけるJ波を特徴とする突然死疾患である。前者は1992年にBrugadaにより病態が報告されてからすでに20年を経た疾患であるのに対し、後者は2008年にHaissaguerreらにより提唱された未だ新しい疾患ともいえる。現在、欧米では、Brugada 症候群と早期再分極症候群とは同一の遺伝的背景、再分極異常に基づいて表現型だけが異なる疾患群との考え方が主流であるが、Na チャネル遮断薬に対する反応や有病率等の疫学は、両者で大きく異なっている。またBrugada 症候群では再分極異常だけでなく、脱分極異常が大きな役割を果たしているとの研究結果や、早期再分極症候群においても、再分極ではなく脱分極に異常があるとの報告も近年相次いでおり、その病像は未だ混沌としている。本研究では早期再分極症候群とBrugada 症候群を全国的な規模で集積し、後ろ向きと前向きに予後を観察し、同時に種々の心電図検査、電気生理学検査、遺伝子検査等を行って両症候群の病態、機序と、予後を解明することを目的とする。

B. 研究方法

本研究では、1)Haissaguerre らの定義した早期

再分極症候群、すなわち、VFの既往を有し、II, III, aVF 誘導と I, aVL, V4-V6 誘導のうち、2誘導以上で notch または slur 波形を呈する 1mm 以上の J 波増高を有する症例と、2)VF の既往のある Brugada 症候群を登録する。可能な例でピルジカイド等の Ic 群薬負荷試験を行い、前胸部誘導での Type1 波形の出現状況を観察する。全例で突然死家族歴と失神歴を聴取し、心蘇生歴のある例では VF の出現時間、出現状況を把握する。必須検査として高位肋間心電図、心エコー図、ホルター心電図、運動負荷検査を、一部の例に加算平均心電図、心磁図検査を行い、同意の得られた例では電気生理学的検査により、心室性不整脈の誘発を右室心尖部と流出路から行う。誘発に用いる期外刺激数は3連発までとし、最短連結期間隔は180msec とする。また、登録症例のうち、同意を得られた症例では末梢血を採取し、ゲノム DNA を抽出する。心筋に発現する Brugada 症候群関連の遺伝子 (SCN5A, CACNA1C 等) を PCR で増幅し、DNA シークエンサーで遺伝子異常を同定する。

これらの結果に基づいて、両症候群の病態と、遺伝子解析を行い、その相違を明らかにすると共に、後ろ向き、ならびに前向きの予後調査結果から、これらの疾患の予後予測指標を明らかにする。

C. 研究結果

この1年間において、過去の研究での登録症例を含め、計130例(VFを伴う早期再分極症候群:49例、VFを伴うBrugada症候群:81例)を登録できた。平均16±11月の前向き経過観察では、VFを伴う早期再分極症候群49例中の6例と、VFを伴うBrugada症候群81例中8例にICD適切作動が生じており、VF再発率には両群間で差を認めなかった。

早期再分極症候群では、前壁誘導のJ波の意義を検討した。VFを伴う下側壁早期再分極症候群31例にNaチャンネル遮断薬を投与し、その反応から1)下側壁誘導(II,III,aVF,I,aVL,V4-V6)のJ波と前壁誘導(V1-V3)にJ波(saddleback型ST上昇またはnotch)を認めるERS(A)群(39%)、2)下側壁誘導にのみJ波を認めるB群(61%)の2群に分類し、それぞれの病態、予後を検討した。その結果、下側壁誘導以外に前壁誘導にJ波を有するERS(A)群では、主として夜間にVF発作が生じ、平均92ヶ月間の経過観察中にVFを繰り返して予後が悪かったのに対し、下側壁誘導にのみJ波を有するERS(B)群は、そのほとんどが体動時にVF発作が生じ、心事故も有意に少なかった。また、ERS(A)群では、高位側壁誘導(I,aVL)にJ波を有する例が多く、Naチャンネル遮断薬負荷により、軽度のJ波上昇を示す例が多かった。

Brugada症候群では、電気生理学検査(EPS)での早期刺激数の意義を検討した。計108例のType1 Brugada症候群に最大3連発までの心室早期期外刺激を加えて、心室性不整脈を誘発し、VFまたは15連発以上の多形性VTが誘発された期外刺激数と長期予後との関係を調べた。その結果、3連発での誘発を含む全体の誘発性と予後とは関連がなかったが、1~2連発刺激で誘発された群の予後は、誘発されなかった群に比べ有意に悪かった。この関係は無症候群、失神群でも認められたことから、EPSでの2連発以下での心室性不整脈誘発性はBrugada症候群の有用な予後指標になると考えられた。

D. 考察

今回の検討により、早期再分極症候群が全く異なる2つの病態から構成されており、約40%はBrugada症候群と類似した病態と不良な予後を示し、残りの約60%は特発性心室細動に類似した病

態と良好な予後を示すことが判明した。しかもそれらは前壁誘導で主として非Type1、つまりsaddleback型のJ波を示すか否かで病態と予後が決定されることが判明した。この結果からは、前壁のJ波を合併した早期再分極症候群では、Brugada症候群と同様に、主として再分極異常からVFが発生することが推定されるが、下側壁誘導だけにJ波をもつ早期再分極症候群は従来の機序では説明が困難な、ある種の脱分極異常に基づいて、VFが生じる可能性が示唆された。また、純粋な下側壁早期再分極症候群ではAntzelevitchらが指摘したような、J波分布別の重症度分類があてはまらないことも確認された。ただ、今回の検討は少数例での検討であるため、多数例での検証が必要と考えられた。今後、本研究が進み、早期再分極症候群の概念が整理されれば、さらに機序の理解が進むと考えられた。

Type1 Brugada症候群のEPSでのVF誘発性に関してBrugadaらは、初期の報告から一貫して予後指標になりうるとの見解を示していたが、一方でPriori・Eckardtらの登録研究などをまとめたメタ解析や、循環器病委託研究などでは予後推定に有用との結果は出てなく、最近報告されたFINGER研究、PRELUDE研究でも否定的な結果を示していた。しかしながら、これまでの研究では、3連発刺激を含むすべての誘発性の有無と予後とを比較していたため、本研究では、早期期外刺激数別に予後を検討したところ、1,2連発で簡単に心室性不整脈が誘発される例の予後が悪いことが判明した。また、この関係は無症候群・失神群でも認められた。これまで、Brugada症候群の中で、無症候、失神例では、その予後推定において信頼できる予知指標がなかった。しかしながら、EPSがBrugada無症候、失神群の有用な予後予知指標になりうることが判明した。この結果に対して、PrioriらはPRELUDE研究の中で、誘発された刺激数と予後との関係には有意な差がなかったと述べている。しかしながら、彼らの誘発法は我々のように一貫した手法を用いていない。このためPRELUDE研究の誘発法では誘発刺激数と予後との関係を評価しえないと考えられる。

E. 結論

VFを伴う早期再分極症候群とBrugada症候群はほぼ同様に不良な予後を呈していた。早期再分極症候群は全く異なった2つの病態から構成されている可能性があり、前壁誘導でのJ波が予後を決定していると考えられた。Type1 Brugada症候群では、電気生理学検査での2連発以下での早期期外刺激による心室性不整脈誘発が、全Brugada症候群のみならず、失神群、無症候群の不良な予後予測に有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawata H, Noda T, Yamada Y, Okamura H, Satomi K, Aiba T, Takaki H, Aihara N, Isobe M, **Kamakura S**, Shimizu W: Effect of sodium-channel blockade on early repolarization in inferior/lateral leads in patients with idiopathic ventricular fibrillation and Brugada syndrome. *Heart Rhythm* 9: 77-83, 2012
2. Makimoto H, **Kamakura S**, Aihara N, Noda T, Nakajima I, Yokoyama T, Doi A, Kawata H, Yamada Y, Okamura H, Satomi K, Aiba T, Shimizu W: Clinical impact of the number of extrastimuli in programmed electrical stimulation in patients with Brugada type 1 electrocardiogram. *Heart Rhythm* 9: 242-248, 2012
3. Watanabe H, Nogami A, Ohkubo K, Kawata H, Hayashi Y, Ishikawa T, Makiyama T, Nagao S, Yagihara N, Takehara N, Kawamura Y, Sato A, Okamura K, Hosaka Y, Sato M, Fukae S, Chinushi M, Oda H, Okabe M, Kimura A, Maemura K, Watanabe I, **Kamakura S**, Horie M, Aizawa Y, Shimizu W, Makita N. Clinical characteristics and risk of arrhythmia recurrences in patients with idiopathic ventricular fibrillation associated with early repolarization. *Int J Cardiol.* 2012;159:238-40.
4. Kamakura T, Kawata H, Yamada Y, Miyamoto K, Okamura H, Noda T, Satomi K, Aiba T, Takaki H, Aihara N, **Kamakura S**, kimura T, Shimizu W.

Significance of latent anterior early repolarization in patients with inferolateral early repolarization syndrome. *J Am Coll Cardiol* in revision.

5. **鎌倉史郎**：心室細動.山口徹・北原光夫・福井次夫(編),今日の治療指針2012年版,医学書院,東京,2012;351-352
6. **鎌倉史郎**：早期再分極症候群.井上博・村川祐二(編),不整脈学,南江堂,東京,2012:517-520
7. **鎌倉史郎**：J波症候群.永井良三・許俊鋭・鄭忠和・澤芳樹(編),循環器疾患の最新医療,先端医療技術研究所,東京,2012:126-128

2. 学会発表

1. **Kamakura S**: Debate:Could Brugada syndrome be treated without ICD; Con. 5th APHRS 2012, Taipei,2012.10.4
2. **鎌倉史郎**：Jwave(波)症候群.第76回日本循環器学会学術集会モーニングレクチャー,福岡,2012
3. Kobayashi T, **Kamakura S**, Miyamoto K, Yamada Y, Okamura H, Noda T, Satomi K, Aiba T, Yasuda S, Shimizu W. Distribution of J waves on 87-lead body surface map in patients with inferolateral early repolarization syndrome. ESC Congress 2012, Munich, 2012
4. Iwakami N, **Kamakura S**, Okamura H, Noda T, Satomi K, Shimizu W, Takaki H, Sugimachi M. Is J-wave a manifestation of ventricular repolarization abnormality? AHA2012, Los Angeles, 2012, Circulation 2012;126:A10813
5. Aiba T, Yokoyama T, **Kamakura S**, Takaki H, Nakajima I, Miyamoto K, Yamada Y, Okamura H, Noda T, Satomi K, Shimizu W, Sugimachi M. Noninvasive evaluation of arrhythmic substrate in the Brugada syndrome using high resolution magnetocardiography. AHA2012, Los Angeles, 2012, Circulation 2012;126:A15888.

先天性心疾患の臨床情報データ・ベース化と遺伝子情報の統合による臨床・基礎総合研究

研究分担者 白石 公 国立循環器病研究センター 小児循環器・周産期部門長

研究要旨：研究要旨：我々は先天性心疾患の原因遺伝子を明らかにする目的で、患児および家族の末梢血リンパ球をEBウイルスにより株化し遺伝子解析を行っている。通算約150例の検体を採取して心臓形態形成に重要な遺伝子を解析した結果、先天性心疾患患児に、*KRAS*, *RAF1*, *PTP11*, *CFC1*における遺伝子変異を検出した。

A. 研究目的：

先天性心疾患の病因は、胎児の遺伝情報の異常（染色体異常、染色体部分欠失、遺伝子変異）、母体の環境要因（ウイルス感染、奇形性のある）挙げられているが、約85%は、原因不明の多因子遺伝と考えられている。すなわ複数の遺伝子異常と環境要因により引き起こされると考えられている。今回私たちは、先天性心疾患を引き起こす遺伝子および環境要因を明らかにし、発症予防につながることを最終目的として、先天性心疾患患者およびその家族から末梢血を採取し、心臓形態形成に重要な遺伝子を解析するとともに、患者の臨床情報を集積する研究を行っている。

B. 研究方法

先天性心疾患患者および家族より末梢血を採取し、リンパ球を分離した後にEBウイルスにより株化（不死化）を行う。まず始めに、新生児を含む幼小児例での採血のため、1～2mlの少量採血からの株化が可能かどうかの基礎実験を行った（京都府立医科大学ゲノム医学教室：田代 啓教授に依頼）。その後、実際には株化されたリンパ球からDNAを分離して、形態形成に重要な遺伝子（*Nks2.5*, *GATA4*, *Tbx1*, *Tbx5*, *Lefty2*, *Nodal*, *Pitx2*, *KRAS*, *RAF1*, *CFC1*, *PTP11*など）のシーケンスを行い、その異常を同定するとともに、患者の臨床情報、母体の妊娠中の環境要因なども調査した（国立循環器病研究センター研究所分子生物学部：森崎隆幸部長ならびに森崎裕子室長が担当）。

（倫理面への配慮）

本研究は国立循環器病研究センター倫理委員会の承認のもとに実施されたとともに、厚生労働省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（平成20年12月1日改訂）に基づき実施されている。患者および代諾者である両親には同意を得て採血と遺伝子解析を行うとともに、遺伝子解析の任意撤回の自由も保障されている。

C. 研究結果

少量採血による株化が可能であることが明らかになったとともに、常温による保管で関連施設から血液を搬送しても株化の効率に影響ないことも明らか

かとなった。この方法によりこれまでに通算約150例の先天性心疾患の患者および家族から血液を採取しリンパ球の株化を行った。現在までに心臓形態形成に重要な遺伝子を解析した結果、先天性心疾患患児に、*KRAS*, *RAF1*, *PTP11*, *CFC1*における遺伝子変異を検出した。

D. 考察

これらの遺伝子異常には過去に報告されて以来ものも含まれており、今後その遺伝学的意義を解析するとともに臨床症状（先天性心疾患）との関連について検討を行う予定である。

E. 結論

先天性心疾患の原因遺伝子を明らかにするとともに先天性心疾患の発症予防を目指して、患児および家族の末梢血リンパ球をEBウイルスにより株化し遺伝子解析をおこない、数種類の遺伝子異常を見いだした。今後は先天性心疾患の発症率を少しでも低下させる研究を手がける予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
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
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特記すべきものなし

遺伝性不整脈の遺伝子解析に関する研究

研究分担者 宮本 恵宏 国立循環器病研究センター 予防健診部 部長
研究協力者 太田 直孝 国立循環器病研究センター 臨床検査部 主任臨床検査技師

研究要旨 遺伝性不整脈疾患は、致死性不整脈を発症し、心臓突然死を引き起こす疾患である。遺伝性不整脈疾患は、先天性 QT 延長症候群 (LQTS)、Brugada症候群 (特発性心室細動)、進行性心臓伝導障害 (PCCD)、カテコラミン誘発性多形性心室頻拍 (CPVT)、QT 短縮症候群 (SQTS)などが含まれるが、LQTSの原因遺伝子はすでに10以上ある。しかし、遺伝子診断で同定される原因遺伝子の殆どがLQT1(KCNQ1)、LQT2(KCNH2)、LQT3(SCN5A)であり、我々の施設ではLQT1、LQT2、LQT3、LQT7の遺伝子変異の同定をPCR直接シーケンス法でおこなっている。2012年のLQTSの遺伝子検査を行った発端者数は122例であり、その内LQT1遺伝子に変異の同定された症例は25例、LQT2遺伝子に変異の同定された症例は25例、LQT3遺伝子に変異の同定された症例は5例、LQT7遺伝子に変異の同定された症例は2例であった。我々の施設では2000年より遺伝子検査を行っているが、遺伝子変異の同定率は54%である。今後は、次世代シーケンス法により見逃されていた変異の同定も考慮する必要がある。

A. 研究目的

遺伝性不整脈疾患は、致死性不整脈を発症し、心臓突然死を引き起こす疾患である。遺伝性不整脈疾患の成因は、心筋のイオンチャネルとこれに関連する細胞膜蛋白、調節蛋白などをコードする遺伝子上の変異による機能障害であり、先天性 QT 延長症候群 (LQTS)、Brugada症候群 (特発性心室細動)、進行性心臓伝導障害 (PCCD)、カテコラミン誘発性多形性心室頻拍 (CPVT)、QT 短縮症候群 (SQTS)などが含まれる。

なかでも LQTS はすでに 10 以上の原因遺伝子が報告されているが、同定される原因遺伝子の殆どが LQT1 (KCNQ1)、LQT2 (KCNH2)、LQT3 (SCN5A) である。また、新たな LQTS の原因遺伝子を同定するためにも、LQT1 (KCNQ1)、LQT2 (KCNH2)、LQT3 (SCN5A) のスクリーニングが必須である。本研究では PCR 直接シーケンス法による LQT1、LQT2、LQT3 に LQT7 を加えた検討について報告する。

B. 研究方法

LQT1遺伝子KCNQ1は染色体11p15.5に存在し、15個のエクソンからなる遺伝子であり、LQT2遺伝子KCNH2は染色体7q35-36にあり、15個のエクソンからなる遺伝子であり、LQT3遺伝子SCN5Aは染色体3p21-24に存在し28個のエクソンからなる。LQT7遺伝子はKCNJ2で染色体17q23に存在する2個のエクソンからなる遺伝子である。

我々はLQT1、LQT2、LQT3、LQT7に対してそれぞれ19対、15対、29対、4対のPCRプライマーセットを作成し、遺伝子の全エクソン領域をPCR直接シーケンス法で両方向からシーケンスを行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヘルシンキ宣言（世界医師会）・ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に準拠して実施する。また本研究は倫理委員会の承認を得ている。本研究では、インフォームド・コンセントの得られた患者から末梢血を採取し、ゲノムDNAを抽出した。患者の血液・ゲノムDNAなどのサンプルは、氏名、生年月日、住所などの個人を特定できる情報を取り除き、代わりに患者識別番号でコード化によって、試料や情報の由来する個人を特定できなくする「匿名化」を行った。提供者と新たにつける符号との対応表は個別識別情報管理者が厳重に管理し、個人が特定できない状態で解析を行った。また、患者に遺伝子異常が確認された場合には、患者の同胞についても遺伝子検索をする必要があることがある。その場合にでも十分な説明と同意を得て遺伝子カウンセリングを行った。

C. 研究結果

2012年のLQTS遺伝子検査を行った発端者数は122例であり、その内LQT1遺伝子に変異の同定された症例は25例、LQT2遺伝子に変異の同定された症例は25

例、LQT3遺伝子に変異の同定された症例は5例、LQT7遺伝子に変異の同定された症例は2例であった。

D. 考察

2012年のLQTSの遺伝子検査での変異の同定率は約47%であった。我々の施設では2001年より2012年まで743例のLQTS発端者に対して遺伝子検査をおこない、402例に変異を同定しており、変異の同定率は54%である。2000年にSplawskiらが262例のLQTSで68%に変異を同定したと報告しているが (Circulation. 2000;102:1178-1185.) その後、Davidらは541例のLQTS症例に対して変異が同定されたのは39% (Heart Rhythm 2005;2:507-517) 、Jamieらも2500例の発端者で遺伝子変異の同定率を36%と報告している (Heart Rhythm 2009;6:1297-1303) 。

我々の施設では2000年よりほぼ50%に変異を同定している。これは、臨床的診断が同一基準で行われていることが主な理由と考えられる。しかし、今後は、塩基配列の決定技術の進歩により、PCR直接シーケンス法では見逃されていた変異が同定されることが予想される。

E. 結論

PCR直接シーケンス法によるLQTSの遺伝子変異のスクリーニングでは約50%に遺伝子変異が同定された。

G. 研究発表

1. 論文発表 Morisaki H, Yamanaka I, Iwai N, Miyamoto Y, Kokubo Y, Okamura T, Okayama A, Morisaki T: CDH13 Gene Coding T-Cadherin Influences Variations in Plasma Adiponectin Levels in the Japanese Population. Hum Mutat 33(2) : 402-10, 2012

2. 学会発表
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
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

遺伝性不整脈の臨床診断、遺伝子解析に関する基礎及び臨床研究

研究分担者 相庭 武司 国立循環器病研究センター心臓血管内科・不整脈科医長

研究要旨

先天性QT 延長症候群(LQTS)は心電図でのQT 時間延長に伴いTorsade de Pointes(TdP)と呼ばれる致死性の心室性不整脈を引き起こし、失神発作や突然死の原因となる疾患である。変異のある遺伝子の種類により現在1~13 のタイプに分類されているが、LQT1~3 型が9 割を占める。遺伝子診断率の向上(50~70%)により遺伝子型と表現型との関連や、さらに同じ遺伝子型でも変異部位別の重症度の違いが検討されてきている。国内の多施設登録研究によって遺伝子型のみならず変異部位による特異的な重症度の評価・治療方法の選択が可能になりつつある。しかし、同一家系内で同じ遺伝子異常を有しているにもかかわらず、心事故の発症リスクに差が認められることも珍しくなく、遺伝子の変異だけですべてが説明可能なわけではない。本研究ではまずこれまでの国内登録研究のデータベースをもとに日本人のQT延長症候群の遺伝子型と表現形(心電図異常など)の関係を明らかにし、さらに変異部位別の予後やβ遮断薬に対する治療抵抗性などを明らかにする。さらにはパッチクランプ実験によるイオンチャネル機能解析を行い、その原因となる分子生物学的基盤を明らかにする。今後は年齢、性差や遺伝子多型の存在などさまざまな修飾因子を考慮し、それに基づく個別リスク評価と治療法の選択が可能となると思われる。

A. 研究目的

先天性QT 延長症候群(LQTS)では遺伝子診断により遺伝子型に沿った特異的な生活指導や治療が実践されつつある。一方で同じ遺伝子型でも変異の種類や領域によって治療効果や予後に差があるなど十分に解明されていない点も多い。そこで本研究では先天性QT 延長症候群多施設登録(厚生労働省研究班)データベースをもとに各遺伝子型(LQT1~3)の遺伝子変異領域と予後、治療効果について検討した。

B. 研究方法

遺伝子型の判明している先天性LQTS患者950例(LQT1:408、LQT2:386、LQT3:112例)における遺伝子異常の特徴と心イベント、治療、予後について検討した。

本研究は、ヘルシンキ宣言に基づく倫理原則、疫学研究に関する倫理指針、独立行政法人等個人情報保護法に基づく追記事項をはじめとする本邦における法的規制要件を遵守し実施する。

C. 研究結果

LQT1(変異計64箇所、発端者:203、家族:205例)では170例に失神の既往があり、そのうち33例(19%)が致死性(心停止、VF)イベントであった。80%の心事故は運動または水泳中で、情動ストレスや安静時の発作は5%以下であった。変異部位ではC末端の比ベ膜貫通領域の変異にイベントの発生が多く、特に致死性イベントはS4-S5 inner loop やS5-pore-S6の変異の患者に多くみられた。β遮断薬

内服後のイベントは18例/158例(11%)に認め、その72%はS5-pore-S6部位の変異であった。

LQT2(変異計172箇所、発端者:219、家族:167例)では190例に失神の既往があり、そのうち52例(27%)が致死性イベントであった。心事故の誘因に運動(10%)は少なく、6割以上が情動ストレス(32%)か安静・睡眠中(32%)で、致死性イベントの半数は安静・睡眠中であった。β遮断薬後も35例/178例(20%)に失神を認めその40%は致死性イベントであった。イベントはS5-pore-S6の変異の患者はそれ以外の変異よりも多く、かつ治療抵抗性であった。

LQT3(変異計32箇所、発端者:66、家族51例)では34例が失神の既往あり、そのうち15例(44%)は致死性イベントであった。心事故は安静・睡眠中(55%)や情動ストレス時(21%)に多く、運動中(10%)は少ない。93%の致死性イベントは安静・睡眠中に生じており、その多くが初回発作であった。発端者、QT時間、S5-S6変異が独立した予後規定因子であるが、致死性イベントに対してはS5-S6変異がそれ以外の変異の7.3倍の危険を認めた。

D. 考察

先天性LQTSでは遺伝子診断率の向上(50~70%)により、遺伝子型と表現型との関連や、さらに同じ遺伝子型でも変異部位別の重症度の違いが検討されてきており、遺伝子型のみならず変異部位による特異的な診断・治療方法の選択が可能になりつつある。

しかし、同一家系内で同じ遺伝子異常を有しているにもかかわらず、心事故の発症リスクに差が認められることも珍しくなく、遺伝子の変異だけですべてが説明可能なわけではない。今後は年齢、性差や遺伝子多型の存在などさまざまな修飾因子を考慮し、それに基づく個別リスク評価と治療法の選択が可能となると思われる。

E. 結論

LQT1~3 では各遺伝子変異部位から予後、治療効果についてある程度予測可能になりつつある。中でも各チャンネルのポア領域の変異は重症度予測として有用である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Aiba T, Barth AS, Hesketh GG, Hashimoto YL, Chakir K, Tunin RS, Greenstein J L, Winslow RL, Kass DA, Tomaselli GF. Cardiac Resynchronization Therapy Improves Altered Na Channel Gating in Canine Model of Dyssynchronous Heart Failure. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2013 May 6. (Epub)
- 2) Nakano Y, Chayama K, Ochi H, Toshishige M, Hayashida Y, Miki D, Hayes CN, Suzuki H, Tokuyama T, Oda N, Suenari K, Uchimura-Makita Y, Kajihara K, Sairaku A, Motoda C, Fujiwara M, Watanabe Y, Yoshida Y, Ohkubo K, Watanabe I, Nogami A, Hasegawa K, Watanabe H, Endo N, Aiba T, Shimizu W, Ohno S, Horie M, Arihiro K, Tashiro S, Makita N, Kihara Y. A Nonsynonymous Polymorphism in Semaphorin 3A as a Risk Factor for Human Unexplained Cardiac Arrest with Documented Ventricular Fibrillation. *PLoS Genet*. 2013 Apr;9(4):e1003364.
- 3) Das S, Aiba T, Rosenberg M, Hessler K, Xiao C, Quintero PA, Ottaviano FG, Knight AC, Graham EL, Boström P, Morrisette MR, del Monte F, Begley MJ, Cantley LC, Ellinor PT, Tomaselli GF, Rosenzweig A. Pathological role of serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1 in adverse ventricular remodeling. *Circulation*. 2012 Oct 30;126(18):2208-19.
- 4) Takigawa M, Kawamura M, Noda T, Yamada Y, Miyamoto K, Okamura H, Satomi K, Aiba T, Kamakura S, Sakaguchi T, Mizusawa Y, Itoh H, Horie M, Shimizu W. Seasonal and circadian distributions of cardiac events in genotyped patients with congenital long QT syndrome. *Circ J*. 2012; 76(9):2112-8. Epub 2012 Jun 23.
- 5) Egashira T, Yuasa S, Suzuki T, Aizawa Y,

Yamakawa H, Matsushashi T, Ohno Y, Toyama S, Okata S, Seki T, Kuroda Y, Yae K, Hashimoto H, Tanaka T, Hattori F, Sato T, Miyoshi S, Takatsuki S, Murata M, Kurokawa J, Furukawa T, Makita N, Aiba T, Shimizu W, Horie M, Kamiya K, Kodama I, Ogawa S, Fukuda K. Disease characterization using LQTS-specific induced pluripotent stem cells. *Cardiovasc Res*. 2012 Sep 1;95(4):419-29.

- 6) Aiba T, Tomaselli G. Electrical remodeling in dyssynchrony and resynchronization. *J Cardiovasc Transl Res*. 2012 Apr;5(2):170-9.
- 7) Sachse FB, Torres NS, Savio-Galimberti E, Aiba T, Kass DA, Tomaselli GF, Bridge JH. Subcellular structures and function of myocytes impaired during heart failure are restored by cardiac resynchronization therapy. *Circ Res*. 2012 Feb 17;110(4):588-97.
- 8) Kawata H, Noda T, Yamada Y, Okamura H, Satomi K, Aiba T, Takaki H, Aihara N, Isobe M, Kamakura S, Shimizu W. Effect of sodium-channel blockade on early repolarization in inferior/lateral leads in patients with idiopathic ventricular fibrillation and Brugada syndrome. *Heart Rhythm*. 2012 Jan;9(1):77-83.
- 9) Makimoto H, Kamakura S, Aihara N, Noda T, Nakajima I, Yokoyama T, Doi A, Kawata H, Yamada Y, Okamura H, Satomi K, Aiba T, Shimizu W. Clinical impact of the number of extrastimuli in programmed electrical stimulation in patients with Brugada type 1 electrocardiogram. *Heart Rhythm*. 2012 Jan;9(1):77-83.

2. 学会発表

- 1) Aiba T, Toyoda F, Makita N, Matsuura H, Makimoto H, Yamagata K, Horie M, Fukushima N, Ogawa S, Aizawa Y, Ohe T, Kusano F K, Yamagishi M, Tanaka T, Makiyama T, Yoshinaga M, Hagiwara N, Sumitomo N, Kamakura S, Shimizu W. Biophysical Properties of Na Channel in the S5-S6 High Risk LQT3 Mutations of the Long QT Syndrome. *AHA 2012*

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

疾患特異的iPS細胞を用いた先天性QT延長症候群の病態解明に関する研究

研究分担者 福田 恵一 慶應義塾大学医学部 循環器内科 教授

研究要旨

遺伝性不整脈疾患の病態解明にあたり、研究分担者の所属する慶應義塾大学病院循環器内科を外来通院または入院加療を行った患者に対し、当該疾患を有している者に対し、書面にて説明と同意を得た上で遺伝子解析目的の採血を行った。これまでに111人のサンプルが集まっており、うち20人で変異同定が可能であった。QT延長症候群に関しては型毎に疾患特異的iPS細胞を作成し、不整脈の病態解明、薬効評価などを行った。疾患特異的iPS細胞を用いた解析は、従来のパッチクランプを用いた解析と結果が一致し、本解析は有用な手段であることが明らかとなった。

A. 研究目的

遺伝性不整脈疾患は突然死の原因となるためその病態解明および早期診断、有効な治療法の検索は急務である。実際に当該疾患の患者において原因遺伝子を同定した上で、疾患特異的iPS細胞を作成し、各種研究、解析を行うことで速やかな実臨床へのフィードバックが可能となる。

B. 研究方法

慶應義塾大学病院循環器内科を外来通院または入院加療を行っている患者に対し、QT延長症候群、ブルガダ症候群、家族性心房細動、家族性ペースメーカー症候群などの当該疾患を有している者に対し、書面にて説明と同意を得た上で遺伝子解析目的の採血を行った。また1型QT延長症候群の家系に関しては疾患特異的iPS細胞を作成し、不整脈の病態解明、薬効評価などを行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析にあたり、本研究の目的、方法、同意書などは慶應義塾大学病院の倫理委員会によって承認されたものである。なお遺伝子解析にあたり研究対象全患者には書面を用いて説明を行い同意書を得た。

C. 研究結果

これまでに111人のサンプルが集まっている。疾患の主な内訳はQT延長症候群27例、ブルガダ症候群18例、家族性心房細動10例であった。うち20人で変異同定が可能であった。

D. 考察

疾患特異的iPS細胞を作製した1型QT延長症候群の患者での基礎的検討では、IK_r遮断薬であるE4031はコントロールおよび患者由来iPS細胞でFPDを延長させ、不整脈が発生した。またIK_s遮断薬であるchromanol 293Bは患者由来のiPS細胞のFPDは延長させず、本患者におけるIK_sの障害が示唆された。

E. 結論

この新しい解析手段は従来のパッチクランプを用いた解析と結果が一致し、本解析は有用な手段であることが示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Egashira T, Yuasa S, Fukuda K. Novel insights into disease modeling using induced pluripotent stem cells. *Biol Pharm Bull.* 2013;36(2):182-8.
- 2) Egashira T, Yuasa S, Suzuki T, Aizawa Y, Yamakawa H, Matsushashi T, Ohno Y, Toyama S, Okata S, Seki T, Kuroda Y, Yae K, Hashimoto H, Tanaka T, Hattori F, Sato T, Miyoshi S, Takatsuki S, Murata M, Kurokawa J, Furukawa T, Makita N, Aiba T, Shimizu W, Horie M, Kamiya K, Kodama I, Ogawa S, Fukuda K. Disease characteriz

ation using LQTS-specific induced pluripotent stem cells. Cardiovasc Res. 2012 Sep 1;95(4):419-29.

- 3) Seki T, Yuasa S, Fukuda K. Generation of induced pluripotent stem cells from a small amount of human peripheral blood using a combination of activated T cells and Sendai virus. Nat Protoc. 2012 Mar 15;7(4):718-28.

2. 学会発表

- 1) 相澤義泰, 高月誠司, 木村雄弘, 西山信大, 福本耕太郎, 谷本陽子, 谷本耕司郎, 三好俊一郎, 鈴木誠, 横山泰廣, 池主雅臣, 相澤義房, 福田恵一. 完全右脚ブロックを呈する特発性心室細動症例の臨床的および心電図学的特徴の検討. 第27回日本不整脈学会学術集会. 2012年7月6日(金). 神奈川県横浜市.
- 2) 湯浅慎介. Disease Modeling Using Human iPS Cells. 第60回日本心臓病学会学術集会. 2012年9月16日. 石川県金沢市.
- 3) 稲川浩平、相澤義泰、高月誠司、勝俣良紀、西山崇比古、木村雄弘、西山信大、福本耕太郎、谷本陽子、谷本耕司郎、湯浅慎介、西森健雄、稲垣雅行、有村卓朗、木村彰方、三田村秀雄、福田恵一. 家族性WPW症候群の1家系における臨床像の検討. 第29回日本心電学会学術集会. 2012年10月12日. 千葉県幕張市.
- 4) Keiichi Fukuda. Keynote Lecture: Use on iPS Cells for the Evaluation of Familial Sudden Death Syndrome. APHRS2012. Taipei, Taiwan.
- 5) Keiichi Fukuda. Generation of Disease-Specific iPS Cells from Circulating Blood Cell Using Sendai Virus. APHRS2012. Taipei, Taiwan.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

遺伝性不整脈のゲノム解析

研究分担者 関根 章博 国立循環器病研究センター 客員部長

研究要旨

Brugada症候群は重篤な不整脈から死に至る可能性の高い疾患であり、原因究明することで、予測診断や新規医療の実現に寄与するものと考えられる。申請者らは当該疾患を罹患した多くの家系を所持している。分担者はこの家系検体を中心に当該疾患の遺伝的発症原因遺伝子（座位）を同定するために次世代シーケンサー（NGS）を用いた全exon解析に着手した。H24年度はNGSデータの取得と解析（bioinformatics）法を確立を目指し、4家系を用いてシステム構築を実施し、広域exon塩基配列の決定ならびにshort variations(配列の短い多型および変異)の抽出を実現し、計画を達成した。少ない家系数の解析では原因は絞り込めないことは当初より推察していたが、予想通り100座を超える座位が候補となった。平成25年度に別の家系および個々の罹患者、さらにコントロール検体の解析を行い、原因遺伝子の同定を実施する計画である。

A. 研究目的

Brugada症候群の遺伝的発症原因遺伝子（座位）を同定するために当該疾患の家系および個々の検体を用いて次世代シーケンサーによる全exon解析を実施する。本年度（平成24年度）は本アプローチが可能となるよう次世代シーケンサーの遂行および解析システムを構築すると共に、可能な限り多くの解析検体を追加することを目標とする。なお、解析実施に伴い原因が同定されれば、予測診断や早期治療を目指し当該疾患の個別化医療の実現を目指す。

B. 研究方法

Brugada症候群と診断された患者さんおよびそのご家族の同意が得られた後、血液からゲノムDNAを抽出し、covarisによるDNA断片化を行い、exonキャプチャーにて広域exon領域を抽出する。これを試料として次世代シーケンサー（Illumina社HiSEQ1000;以下NGS）による広域exon配列決定をpair-end法により実施する。配列決定はbioinformaticsにより行うが、この際、raw dataはCASAVAにてFastqデータに、さらにBWA/bowtieにてマッピングを、Picardにて重複除去を、GATK/Samtoolsにて多型検出を、Pindelにてゲノム構造異常を検出し、さらに配列の決定できない領域はPindelにてアノテーションを実施するとともに

に独自開発プログラムにてホローアップする。得られた多型や構造異常から当該疾患と関連するものを抽出するために、家系検体ではノンパラメトリック解析を、個々の検体では家系解析から得られた多数の候補座位の確認ならびに相関解析にて原因座位を同定する。

（倫理面への配慮）

すでに当該研究における倫理申請・承認を得ると共に、患者さんには十分な説明を行った上で同意を得て研究に活用している。また、常時「撤回」の機会があり、研究に賛同できない場合には以降の情報を削除する。また、NGSから得られる情報は個人の身体的特徴ともなるため、解析に用いる試料は匿名化の上、解析に用いる機器および解析計算機は立入りの制限のかかった管理室内に設置し、インターネット非接続下で実施している。連結は個人情報管理者のみが実施できる体制で取組んでいる。

C. 研究結果

本年度はBrugada症候群を罹患した患者さんを含む4家系について全exon解析を実施した。この4家系の罹患者を中心として、exon配列の決定ならびに多型（short variations）の抽出は研究方法に従い実現し、計画通りに進んだと判断している。ところで、Brugada症候群はいずれの家系ともに優性遺伝継承（両親のいずれかが罹患しているとそのお子

さんの一部に罹患する)によって発症することが強く疑われるが、保因者x罹患者から劣性遺伝型で発症する可能性も疑って解析を実施している。解析対象者の塩基配列および多型 (short variations) 情報は全て取得できたが、現状4家系の解析では100座を超える候補座位が浮上している。このことは試験開始前からすでに予測していたことで、本年度に研究協力をお願いしていた別の家系および個々の患者さんの検体の解析を組合わせて平成25年度に原因究明を行う予定でいる。

D. 考察

平成24年度までに報告されたshort variations (配列の短い多型と変異) 数は約5,500万にのぼり、これにstructure variations (配列の長い多型) が追加される。この中からBrugada症候群となる原因を同定することになるので、擬陽性を掴む可能性がある。これを回避するには、解析に耐えうる症例数とコントロール検体の確保が重要となる。申請者らはこれまでに多くのBrugada症候群の検体を整備するとともに、5000例を超すコントロールサンプルを所持している。原因座位の信憑性を高めるには、①家系間で共有する座位、②個々Brugada症候群に多くみられる配列、③Brugada症候群を含まないコントロール群の中に同定されない配列を決定する必要があるが、これらの準備が整ったといえ、H25年度にこれらの解析を進めることで原因が究明されるものと推察している。

E. 結論

平成24年度は当初の目的であったNGSによる全exon解析のシステムを完成させ、同時に検出力を確保するための検体の収集を実現でき、計画通りに進んでいると判断している。すでにH25年度に実施する解析検体やスケジュールも決定しており、本年度構築したNGSによる解析によって原因座位がexon上に存在すれば同定できる見込みとなった、但し、万が一、原因がexon上に存在しない可能性もあるので、解析については、exon領域のみならず、NGSによる全ゲノム解析からのゲノム構造異常による発症原因へのアプローチならびに迅速なゲノム広域へのアプローチであるGWAS(Genome-Wide Association Study)のシステムも構築し、全exon解析で原因が究明されな場合の対応策も確保した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshimura K et al (3rd author) : B-type natriuretic peptide as an independent correlate of nocturnal voiding in Japanese women. *Neurourol Urodyn* , 2012 (PMID: 22532404)
2. Hotta K et al (last author) : Association between type 2 diabetes genetic susceptibility loci and visceral and subcutaneous fat area as determined by computed tomography. *J Hum Genet.* 57:305-310, 2012
3. Li H. et al. (13th author) : Association of genetic variation in FTO with risk of obesity and type 2 diabetes with data from 96,551 East and South Asians. *Diabetologia.* 55:981-995, 2012
4. Hotta K et al (last author) : Genetic variations in the CYP17A1 and NT5C2 genes are associated with a reduction in visceral and subcutaneous fat areas in Japanese women *J Hum Genet.* 57:46-51, 2012
5. Hotta K et al (last author) : Computed tomography analysis of the association between the SH2B1 rs7498665 single-nucleotide polymorphism and visceral fat area *J Hum Genet.* 56:716-719, 2011
6. Hotta K et al (last author) : Association of variations in the FTO, SCG3 and MTMR9 genes with metabolic syndrome in a Japanese population. *J Hum Genet.* 56:647-651, 2011

2. 学会発表

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

原因が同定されれば予測診断のための特許を申請する予定でいる。

2. 実用新案登録

3. その他

Brugada症候群の原因座位が明らかになれば、当該領域専門医と連携し、国立循環器病研究センターにてリスク遺伝子型を所持するかを調査できる体制としたい。