

## 進行性心臓伝導障害の新規原因遺伝子に関する研究

研究分担者 蒔田 直昌 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 分子生理学 教授

研究要旨 進行性心臓伝導障害(PCCD)は、心臓刺激伝導系の進行性変性によってペースメーカー植え込みや突然死の原因となる稀な致死性遺伝性不整脈である。本研究の目的は、PCCD家系の分子基盤を解明するために、既知のPCCD原因遺伝子に異常のない家系に対して網羅的エクソーム解析を行い、新規原因遺伝子を解明することである。国内外のPCCD発端者57例（男37人女20人）の遺伝子解析で、心筋Naチャンネル(*SCN5A*) 13個、ラミンA/C (*LMNA*)に12個、コネキシン40 (*GJA5*)に1個を同定した。変異が同定されなかった2家系のエクソーム解析を行った、PCCD大家系に第2染色体上の遺伝子Xの変異を同定した。またもう一つの家系で明らかになった第16染色体上の遺伝子Yについてその他のPCCD家系でスクリーニングしたところ、1症例に遺伝子Yの別のミスセンス変異が同定された。現在これら2つの遺伝子X・Yについて、新規原因遺伝子としての妥当性を国際共同研究体制で検討している。

### A．研究目的

進行性心臓伝導障害(PCCD)は、進行性の房室ブロック・脚ブロックという心電図所見を特徴とし、心臓刺激伝導系の線維変性によって突然死をきたす稀な致死性不整脈で、Lenégre-Lev 病ともよばれる。PCCD に特徴的な心電図のうち右脚ブロックは正常亜型として健常人にも認められるため、明白な家族歴がなければ、単回的心電図だけでハイリスクグループを発症前に特定するのは極めて困難である。また、Brugada 症候群や拡張型心筋症の合併例の報告もあることから、PCCD の分子病態を解明し、迅速かつ有効な診断法を確立し、心臓伝導障害による突然死を予防することは重要な課題である。

本研究の目的は、PCCD の分子基盤を明らかにするために、まずこれまで集積した家系のゲノムを用いて既知の原因遺伝子をスクリーニングする。次いで、変異が同定されない家系に対して網羅的エクソーム解析を行い、新規原因遺伝子を解明する。

### B．研究方法

インフォームドコンセントの得られた PCCD 発端者 57 症例（日本人 47 人、トルコ人 10 人；男 37 人・女 20 人、平均 55.8±24.1 歳）及びその家族 41 症例を対象に、末梢血ゲノム DNA を抽出し、遺伝子解析を行った。対象遺伝子は、Na チャンネル(*SCN5A*, *SCN1B*, *SCN2B*, *SCN3B*, *SCN4B*)、K チャンネル(*KCNQ1*, *KCNH2*, *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNJ2*, *KCNJ8*, *HCN4*)、コネキシン(*GJA1*, *GJCL*, *GJA5*)、ラミン A/C(*LMNA*)、転写因子(*IRX3*, *TBX5*,

*NKX2.5*)である。各遺伝子のエクソン周囲を PCR で増幅し直接シーケンス法でスクリーニングした。これらの遺伝子に変異を認めなかった発端者のうち家族性が明白な2家系においてエクソーム解析を行った。エクソームの情報下記で候補となった遺伝子について、家族のゲノムも含めサンガー法で再シーケンス解析を解析した。（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（平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済通産省告示第 1 号）に準拠して実施した。

### C．研究結果

*SCN5A*のcodingエクソン領域に11個、5'非翻訳領域に1個、プロモータ領域に1個の変異を同定した。codingエクソン変異11個のうち8個はミスセンス変異で、3個は1塩基欠損によるフレームシフト欠失変異だった。プロモータ変異(g.-115G>T)のプロモータ活性をルシフェラーゼ法で測定したところ、正常配列に比べて73%低下していることが判明し、*SCN5A*の転写活性が著しく低下していなう。*LMNA*では、変異12個のうち6個がミスセンス変異、フレームシフト欠失5個、スプライシング変異1個だった。*GJA5*はPurkinje線維に強くするギャップ結合だが、その変異はコンダクタンスを1/40に低下する機能異常を有していた。

候補遺伝子アプローチによって変異が同定されなかったPCCD症例のうち、比較的大きな2家系(A・B)を選定しエクソーム解析を行った。dbSNP, 1000ゲノムデータベースに登録されたバリエーション

をフィルター処理後、循環生理への関与が推測される遺伝子のミスセンスバリエーション、欠失・挿入バリエーションを候補として20個ずつ選定した。それぞれバリエーションについての家族の遺伝型をサンガー法で確認し、表現型と一致の見られるものを変異の候補とした。

家系Aは罹患者17人・非罹患者7人のゲノムが保存されている大家系で、エクソーム解析によって第2染色体上の遺伝子Xが候補遺伝子としてリストアップされた。遺伝子Xのミスセンス変異L80Vの遺伝型は家系内で遺伝型と完全に cosegregate していた。L80VはdbSNP、1000ゲノムに登録されておらず、フランス人241人にも認めないため疾患遺伝子変異であることが示唆されたが、日本人1,304人中24人(0.9%)に同定された。したがってL80Vが人種得意的な多型で、遺伝子Xそのものは真の疾患遺伝子に物理的近傍に存在している可能性が高い。今後さらなる精査によって真の疾患遺伝子の解明をめざす。

家系Bは罹患者3人・非罹患者3人で、第16染色体上の遺伝子Yの変異が臨床像と cosegregate した。別のPCCD家系の患者40人のゲノムを用いて遺伝子Yを再シーケンスしたところ、1症例に異なるミスセンス変異が同定され、遺伝子Yは新たな原因遺伝子である可能性が示唆された。

#### D . 考察

SCN5AとLMNAは最も頻度の高いPCCDの原因遺伝子である。遺伝子変異はアミノ酸置換や欠失、スプライシング異常によってタンパクの構造を・機能を変化させるだけでなく、プロモータ活性の低下による転写異常も新たな病態であることが判明した。

エクソームによって2つの遺伝子が新規原因遺伝子候補として同定された。これらが疾患遺伝子であることを確定するためには、より多くのPCCD症例において同一遺伝子上の変異を同定することが必要である。これらの遺伝子は巨大なため、サンガー法によるスクリーニングは困難で、次世代シーケンサーを用いたターゲット再シーケンスを行う予定、その準備中である。

また、家系Aについては、遺伝子X周辺のさらに詳細な遺伝子解析を行い、原因遺伝子を究明すると同時に（フランスINSERM Schott博士との共同研究）、患者末梢血からiPS心筋細胞を作製し、その機能解析を行う予定である（本研究班員、京都大学牧山武助教との共同研究）。

#### E . 結論

候補遺伝子アプローチによって、PCCDの約4割の症例に遺伝子変異を同定した。そのうちSCN5A LMNAが最も頻度が多かった。エクソーム解析によって2つの新たな疾患遺伝子候補が見つかった。

#### F . 健康危険情報

なし

#### G . 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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
2. 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;5:e60-e61
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. 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
5. Delmar M, Makita N. Cardiac Connexins, Mutations and Arrhythmias. *Curr Opin Cardiol.* 2012;27:236-241
6. Egashira T, Yuasa S, Suzuki T, Aizawa Y, Yamakawa H, Matsuhashi T, Ohno Y, Tohyama 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;95:419-429
7. 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.* in press
  8. Ishikawa T, Sato A, Marcou CA, Tester DJ, Ackerman MJ, Crotti L, Schwartz PJ, Ono YK, Park JE, Nakamura K, Hiraoka M, Nakazawa K, Sakurada H, Arimura T, Makita N, Kimura A. A Novel Disease Gene for Brugada Syndrome: Sarcolemmal Membrane-Associated Protein Gene Mutations Impair Intracellular Trafficking of hNav1.5. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2012;5:1098-1107
  9. Ishikawa T, Takahashi N, Ohno S, Sakurada H, Nakamura K, Ono YK, Park JE, Makiyama T, Horie M, Arimura T, Makita N, Kimura A. A Novel SCN3B Mutation Associated with Brugada Syndrome Affects Intracellular Trafficking and Function of Nav1.5. *Circ J.* in press
  10. Nakano Y, Chayama K, Ochi H, Toshisige 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, Ono S, Horie W, 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.* in press
  11. Shimada T, Ohkubo K, Abe K, Watanabe I, Makita N. A novel 5' splice site mutation of SCN5A associated with Brugada syndrome resulting in multiple cryptic transcripts. *Int J Cardiol.* 2012; 158: 441-3
  12. 蒔田直昌：特発性心室細動とJ波症候群の遺伝子診断 CIRCULATION Up-to-Date 7:20-25,2012
  13. 蒔田直昌：早期再分極とJ波症候群：オーバービュー．心臓 44:1226-1231,2012
  14. Makita N. Phenotypic overlap of lethal arrhythmias associated with cardiac sodium mutations. Individual-specific or mutation-specific? . *Genes and Cardiovascular Function.* 2012:185-196
  15. 蒔田直昌：遺伝子とチャネルからみた先天性QT延長症候群 不整脈学 南江堂（井上博 村川裕二編集）491-495, 2012
  2. 学会発表
  1. Makita N. Genetic Diagnosis of Hereditary Lethal Arrhythmias. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2012年3月17日, Fukuoka Japan.
  2. Makita N. Is it the Prime Time to Treat the Patients with Early Repolarization? The 5th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session, 2012年10月5日, Taipei Taiwan.
  3. Aiba T, Makimoto H, Yamagata K, Horie M, Ogawa S, Aizawa Y, Ohe T, Kusano K, Yamagishi M, Makita N, Tanaka T, Makiyama T, Yoshinaga M, Hagiwara N, Sumitomo N, Kamakura S, Miyamoto Y, Yasuda S, Shimizu W. Brugada Syndrome Mutation Site-specific Differences in Arrhythmic Risk in the LQT3 Form of Congenital Long QT Syndrome. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2012年3月16日, Fukuoka Japan
  4. Ishikawa T, Sato A, Arimura T, Sakurada H, Makita N, Kimura A. A Novel Mechanism of Brugada Syndrome: Mutation of Sarcolemmal Membrane-associated Protein (SLMAP) Gene Impaired hNav1.5 Function. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2012年3月16日, Fukuoka Japan.
  5. Makita N, Makiyama T, Seki A, Nogami A, Ohkubo K, Watanabe I, Shimizu W, Watanabe H, Sumitomo N, Horie M, Delmar M. Clinical features and genetic basis of 63 patients with progressive cardiac conduction defect. *Heart Rhythm* 9: S249, 2012 (Heart Rhythm Society, Boston, USA)
  6. Makita N. "Molecular and Physiological Basis of Familial Progressive Heart Block Type-I" The 1st HD Physiology International Symposium: Integrative Multi-level Systems Biology for In silico Cardiology and Pharmacokinetics, 2012年1月21日, Tokyo Japan
  7. Yagihara N, Yagihara N, Watanabe H, Aizawa T, Ohno S, Shimizu W, Chatel S, Koopmann T, Yang P, Hasegawa K, Wakasugi M, Onodera O, Kuwano R, Duboscq-Bidot L, Redon R, Horie M, Schott J, Takayama M, Nakano Y, Bezzina C, Momotani T, Endo N, Darbar D, Roden D, Makita N. Arrhythmia-associated variant in the SCN5A promoter and regulatory regions. (American Heart Association Annual Meeting, Los Angeles USA)
  8. Aiba T, Toyoda F, Makita N, Matsuura H, Makimoto H, Yamagata K, Hoire M, Fukushima N, Ogawa S, Aizawa Y, Ohe T, Kusano K, Yamagi

shi 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. (American Heart Association Annual Meeting, Los Angeles, USA)

H . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

(研究協力者)

野上明彦 (横浜労災病院)

関 明子 (東京女子医大)

Can Hasdemir (Ege University School of Medicine, Turkey)

Jean-Jacques Schott (INSERM, Nantes, France)