

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ーで管理して、情報が漏洩しないよう個人情報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-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