

家族性洞不全症候群の遺伝子基盤に関する研究

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 分子遺伝学 教授

研究要旨

家族性洞不全症候群(SSS)はまれな徐脈性不整脈で、一部の症例に心筋NaチャンネルSCN5AやペースメーカーチャンネルHCN4の遺伝子変異が報告されているが多くの症例では原因が未解明である。近年、ゲノムワイド関連解析から、安静時心拍数やSSSの発症に α -ミオシン重鎖(α -MHC)遺伝子MYH6が関連していることが報告された。本研究の目的は、家族性SSSの遺伝子解析と変異の機能異常と臨床像の比較検討によって、家族性SSSの新たな分子病態を解明することである。家族性SSS 15家系の遺伝子解析で5家系に6個のSCN5A変異と1家系に新規MYH6変異を同定した。SCN5A変異はいずれもNaチャンネル特性を低下させる異常を示した。家族性SSS 29例のメタ解析から、SCN5Aを有するSSSの発症は極めて若年で男性が多いことが判明した。またSSS 1家系で同定したMYH6の欠失変異を心筋細胞に発現させるとサルコメアが破壊されることから、遺伝性不整脈の新たな分子基盤として、心筋サルコメア障害を介する系が存在することが推測された。

A. 研究目的

洞不全症候群(SSS)は頻度の高い徐脈性不整様々な心疾患や老化に伴って発症することが多い。しかしまれに、若年発症や家族内発症を示す家族性SSSも見られる。家族性SSSの原因としては、これまでに心筋Naチャンネル遺伝子SCN5Aやペースメーカー遺伝子HCN4の変異が報告されている。また最近のゲノムワイド関連解析から、SSSの発症に α -ミオシン重鎖(α -MHC)遺伝子MYH6が関与していることも報告されている。

本研究の目的は、家族性SSS家系の遺伝子解析を行い、同定した変異の機能と臨床像の比較検討によって、その分子病態を解明することである。

B. 研究方法

インフォームドコンセントの得られた家族性SSS発端者15症例とその家族を対象に、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)、Kチャンネル(KCNJ3, HCN4)、コネキシン(GJA1, GJCL, GJA5)、ラミンA/C(LMNA)、 α -ミオシン重鎖(MYH6)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。また非家族性SSS症例の臨床像は、長崎大学・日本大学・横浜労災病院から心疾患の合併のないSSS症例538例を集積し解析した。

SCN5A変異はtsA-201細胞の発現系を用いwhole-cell patch clamp法でNa電流を測定した。MYH6変異の*in silico* simulationはSwiss-Plotを用いた。正常または変異 α -MHCのGFP融合プラスミドを新生ラット心筋細胞にトランスフェクション

し、抗actinin抗体を用いて免疫染色後、共焦点顕微鏡でサルコメアの構造を分析した。

(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

1. SCN5A変異と機能異常

15家系の家族性SSSのうち5家系に以下の6個のSCN5A変異を同定した。1) in-frame欠失挿入変異(801_803delMSN/insS)とM1880Vの複合ヘテロ変異, 2) R219H, 3) 2塩基欠失変異(L1786fsX2), 4) D1275N, 5) E1784Kである。D1275N, E1784KはNa電流を低下させるloss-of-functionの機能異常を有することがすでに判明している。本研究では、1)~3)の4つのSCN5A変異のNaチャンネル特性を解析した。その結果、L1786fsX2は無機能で、残りの3つの変異はいずれも正常SCN5Aよりも電流密度が低下し、不活性化または活性化の電位依存性がそれぞれ過分極側、脱分極側に偏位していた。以上から、今回同定した6つのSCN5A変異はいずれもNa電流を低下させるloss-of-functionの特性を有することが判明した。

2. SCN5A変異と発症年齢、性差

家族性SSS発端者の平均発症年齢は35.5歳(n=15)で、非家族性SSSの74.3歳(n=538)に比べ有意に若年であった。SCN5A変異の有無で比較すると、SCN5Aキャリアの平均発症年齢は12.4歳(n=5)で、非キャ

リア47.0歳(n=10)より有意に若かった。これらの知見を再確認するために、既報のSCN5A陽性家族性SSS発端者14人を含めた29家系でメタ解析したところ、SCN5Aキャリアは有意に若年発症(20.9歳)であるとともに、強い男性優位性(23/29, 79.3%)を示すことが判明した。さらに、Brugada症候群やQT延長症候群の合併を除いた家族性SSS発端者11名では、その傾向がさらに強かった(7.8歳、男性91%)

3. MYH6変異解析・機能解析

最近のGWASから、MYH6が安静時脈拍数と関連すること、SSS発症の危険性を高める遺伝子多型が存在することが判明している。我々はMYH6が家族性SSSの新規疾患遺伝子であるか否かを探るために、既知の疾患遺伝子(SCN5A, HCN4)に変異がない家族性SSS発端者9人を選択し、PCR・サンガー法でMYH6変異スクリーニングを行った。その結果、ペースメーカーを植え込んだ62歳女性の発端者に、in-frame 3塩基欠損によって1アミノ酸が脱落する欠失変異(delE933)が同定された。母親はすでに死亡しているが同様にペースメーカーを植え込んでいた。子孫がないためそれ以上の家族性は確認できない。

MYH6は心房筋に強く発現する α -ミオシン重鎖(α -MHC)の遺伝子である。このアミノ酸欠損変異delE933は、ミオシン結合タンパクC(MyBP-C)と機能的結合に重要な役割を果たすS2領域に存在し、進化的に極めて保存性の高い α ヘリックス上に存在していた。In silico simulationではdelE933はこの α ヘリックスに大きな構造変化をもたらすことが予測された。

α -MHCのアイソフォームである β -MHCの遺伝子MYH7には、300種以上の肥大型心筋症・拡張型心筋症の遺伝子変異が報告されている。一方MYH6変異の報告は少ないが、A1366Dなど先天性心疾患の原因となる一部の变異は、心筋細胞に発現させるとサルコメアの破壊をもたらすことがすでに知られている。また、最近のGWASから、MYH6バリエーションR721Wは、SSS発症の危険性と関連することが確認されている。しかしMYH6のバリエーションがどのようにして洞機能不全をもたらすかは未解明である。そこで我々は、今回同定したSSSのMYH6変異delE933、GWASでSSSとの連関が示されたバリエーションR721W、先天性心疾患変異A1366Dを新生ラット心筋細胞に発現させ、サルコメア構造の形態的变化を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、正常MYH6は過剰発現させても心筋サルコメア構造は保存されるが、delE933、R721W、A1366DのMYH6変異・バリエーションはいずれも、心筋細胞のサルコメアを破壊することが判明した。

D. 考察

15家系の家族性SSSと既知の14家系を加えたメタ解析と、SSSの遺伝子変異・機能異常から、家族性

SSSのSCN5A変異は機能低下型の機能異常を有すること、若年男性の発症が極めて多いことが判明した。Naチャネルの機能異常と男性優位性には、Brugada症候群との類似性を認める。SCN5A陽性のSSS症例が将来Brugada症候群を発症するかどうかは長期の経過観察が必要だが、若年発症のSSSの少なくとも一部にBrugada症候群の危険性を有する症例があることは示唆される。

α -MHCは主として心房筋に発現する。MYH6変異がどのように洞機能不全を発症するかは不明であるが、今回我々がSSSに同定したMYH6変異がサルコメアの破壊をもたらしたことから、MYH6の変異による家族性SSSの発症機転として心房筋のサルコメア破壊が関与している可能性が考えられる。事実、MYH6変異を発現するゼブラフィッシュでは心房筋の一部が収縮欠損が報告されている。以上から、SSSと関連するMYH6の遺伝子変異やバリエーションは、心房筋のサルコメアの破壊を介して洞結節機能を障害し、SSSを発症するという新たなメカニズムが推測された。

E. 結論

先天性SSSのもっとも強い分子基盤はSCN5Aの遺伝子異常であり、変異を有する症例は極めて若年で男性が多いという特徴を有している。さらに、SSSの新たな分子基盤としてMYH6変異による心房筋サルコメアの破壊があげられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Abe K, Machida T, Sumitomo N, Yamamoto H, Ohkubo K, Watanabe I, Makiyama T, Fukae S, Kohno M, Harrell DT, Ishikawa T, Tsuji Y, Nogami A, Watabe T, Oginosawa Y, Abe H, Maemura K, Motomura H, Makita N. Sodium channelopathy underlying familial sick sinus syndrome with early onset and predominantly male characteristics. Circ Arrhythm Electrophysiol; in revision
2. Makita N, Yagihara N, Crotti L, Johnson CN, Beckmann BM, Shigemizu D, Lichtner P, Ishikawa T, Aiba T, Homfray T, Behr ER, Klug D, Denjoy I, Mastantuono E, Theisen D, Tsunoda T, Satake W, Toda T, Nakagawa H, Tsuji Y, Tsuchiya T, Yamamoto H, Miyamoto Y, Endo N, Kimura A, Ozaki K, Motomura H, Suda K, Tanaka T, Schwartz PJ, Meitinger T, Käb S, Guicheney P, Bhuiyan ZA, Shimizu W, Watanabe H, Chazin WJ, George AL Jr. Novel calmodulin (CALM2) mutations associated with congenital arrhythmia susceptibility. Circ Cardiovasc Genet; in revision
3. Ohno S, Omura M, Kawamura M, Kimura H, Itoh H, Makiyama T, Ushinohama H, Makita N, Horie M. Exon 3 deletion of RYR2 encoding cardiac ryanodine receptor is associated with left ventricular non-compaction. Europace. 2014;in press

4. Katsuomi G, Shimizu W, Watanabe H, Noda T, Nogami A, Ohkubo K, Makiyama T, Takehara N, Kawamura Y, Hosaka Y, Sato M, Fukae S, Chinushi M, Oda H, Okabe M, Kimura A, Maemura K, Watanabe I, Kamakura S, Horie M, Aizawa Y, Makita N, Minamino T. Efficacy of bepridil to prevent ventricular fibrillation in severe form of early repolarization syndrome. *Int J Cardiol*. 2014
 5. Yoshida M, Ando S, Chishaki A, Makita N, Hasegawa Y, Narita S, Momii H, Kadokami T. Normal dose of pilsicainide showed marked negative inotropic effects in a patient who had no underlying heart disease. *J Arrhythmia*. 2013:in press
 6. 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*. 2013;165:e21-23
 7. 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;9:e1003364
 8. Makita N. Paradigm shifts in the genetics of inherited arrhythmias: Using next-generation sequencing technologies to uncover hidden etiologies. *J Arrhythmia*. 2013;29:305-307
 9. Kawakami H, Aiba T, Yamada T, Okayama H, Kazatani Y, Konishi K, Nakajima I, Miyamoto K, Yamada Y, Okamura H, Noda T, Satomi K, Kamakura S, Makita N, Shimizu W. Variable phenotype expression with a frameshift mutation of the cardiac sodium channel gene *SCN5A*. *J Arrhythmia*. 2013;29:291-295
 10. 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*. 2013;77:959-967
 11. Hasegawa K, Ohno S, Itoh H, Makiyama T, Aiba T, Nakano Y, Shimizu W, Matsuura H, Makita N, Horie M. A rare *KCNE1* polymorphism, D85N, as a genetic modifier of long QT syndrome. *J Arrhythmia*. 2013
 12. Bezzina CR, Barc J, Mizusawa Y, Remme CA, Gourraud J-B, Simonet F, Verkerk AO, Schwartz PJ, Crotti L, Dagradi F, Guicheney P, Fressart V, Leenhardt A, Antzelevitch C, Bartkowiak S, Schulze-Bahr E, Zumhagen S, Behr ER, Bastiaenen R, Tfelt-Hansen J, Olesen MS, Kaab S, Beckmann BM, Weeke P, Watanabe H, Endo N, Minamino T, Horie M, Ohno S, Hasegawa K, Makita N, Nogami A, Shimizu W, Aiba T, Froguel P, Balkau B, Lantieri O, Torchio M, Wiese C, Weber D, Wolswinkel R, Coronel R, Boukens BJ, Bezieau S, Charpentier E, Chatel S, Despres A, Gros F, Kyndt F, Lecoite S, Lindenbaum P, Portero V, Violleau J, Gessler M, Tan HL, Roden DM, Christoffels VM, Marec HL, Wilde AA, Probst V, Schott JJ, Dina C, Redon R. Common variants at *SCN5A-SCN10A* and *HEY2* are associated with brugada syndrome, a rare disease with high risk of sudden cardiac death. *Nat Genet*. 2013;45:1044-1049
 13. Abe Y, Sumitomo N, Okuma H, Nakamura T, Fukuhara J, Ichikawa R, Matsumura M, Miyashita M, Kamiyama H, Ayusawa M, Watanabe M, Joo K, Makita N, Horie M. Successful control of life-threatening polymorphic ventricular tachycardia by radiofrequency catheter ablation in an infant. *Heart Vessels*. 2013:1-5
 14. 蒔田直昌. 遺伝性不整脈研究の黎明期とその後の急速な展開. 日本心電学会 30 年の軌跡. 2013:154-157
 15. 蒔田直昌. 心臓伝導障害の遺伝子基盤. 不整脈 2013. 2013:12-22
 16. 蒔田直昌. 【致死性不整脈診療の最前線】致死性不整脈診療 遺伝性心臓伝導障害. 最新医学. 2013;68:1588-1596
 17. 蒔田直昌. 【イオンチャネル病のすべて】進行性心臓伝導障害. 医学のあゆみ. 2013;245:802-809
 18. 蒔田直昌. 難治性不整脈の遺伝子解析. 循環器専門医. 2013;21:3-8
2. 学会発表
 1. Sonoda K, Watanabe H, Ashihara T, Sato A, Yagihara N, Otuki S, Hasegawa K, Katsuomi G, Iijima K, Izumi D, Furushima H, Horie M, Makita N, Minamino T. A loss-of-function mutation in *SCN5A* associated with monomorphic ventricular tachycardia in Brugada syndrome. 6th APHRS Cardio Rhythm 2013. 2013年10月4日, Hong Kong
 2. Nakao M, Kobayashi S, Makita N. Familial neurally mediated syncope. Venice Arrhythmias 2013. 2013年10月28日, Venice, Italy
 3. Nakano Y, Chayama K, Ochi H, Toshishige M, Tokuyama T, Oda N, Uchimura-Makita Y, Kajihara K, Sairaku A, Motoda C, Fujiwara M, Watanabe Y, Kawazoe H, Ikenaga H, Matsumura S, Oda N, Suenari K, Yoshida Y, Ohkubo K, Watanabe I, Nogami A, Watanabe H, Hasegawa K, Aiba T, Ohno S, Shimizu W, Horie M, Tashiro S, Makita N, Kihara Y. Nonsynonymous polymorphism in semaphorin 3a as a risk factor for human unexplained cardiac arrest with documented ventricular fibrillation. American

Heart Association Scientific Sessions 2013.2013年11月18日,Dallas, Texas

4. Makita N, Yagihara N, Crotti L, Johnson CN, Beckermann B, Shigemizu D, Watanabe H, Ishikawa T, Aiba T, Mastantuono E, Tsunoda T, Nakagawa H, Tsuji Y, Tsuchiya T, YamamotoH, Miyamoto Y, Endo N, Kimura A, Ozaki K, Motomura H, Suda K, Tanaka T, Schwartz PJ, Meitinger T, Käb S, Shimizu W, Chazin W, George AL. CALM2 mutations associated with atypical juvenile long QT syndrome. American Heart Association Scientific Sessions 2013.2013年11月18日,Dallas, Texas
5. Makita N. Genetic mutation. Venice Arrhythmias 2013.2013年10月28日,Venice, Italy
6. Makita N. Is it the prime time to treat the patients with early repolarization? 6th APHRS Cardio Rhythm 2013.2013年10月4日,Hong Kong
7. Kawakami H, Aiba T, Okayama H, Kazatani Y, Nakajima I, Miyamoto K, Yamada Y, Okamura H, Noda T, Satomi K, Kamakura S, Makita N, Shimizu W. Variable expressivity of phenotype in the V1764fsx1786 mutation of cardiac sodium channel *SCN5A*. Heart Rhythm Society 34th Annual Scientific Sessions.2013年5月9日,Denver USA
8. Katsumi G, Shimizu W, Watanabe H, Noda T, Nogami A, Ohkubo K, Takehara N, Kawamura Y, Hosaka Y, Makiyama T, Sato M, Fukae S, Chinushi M, Oda H, Okabe M, Kimura A, Maemura K, Watanabe I, Kamakura S, Horie M, Aizawa Y, Makita N, Minamino T. Efficacy of bepridil to prevent ventricular fibrillation in early repolarization syndrome. American Heart Association Scientific Sessions 2013.2013年11月20日,Dallas, Texas
9. Ishikawa T, Nogami A, Kowase S, Kimura A, Makita N. A cardiac β -myosin heavy chain (*MYH6*) mutation impairing sarcomere structure responsible for familial sick sinus syndrome. American Heart Association Scientific Sessions 2013.2013年11月17日,Dallas, Texas
10. Harrell DT, Tominaga I, Abe K, Watabe T, Oginosawa Y, Okishige K, Abe H, Sumitomo N, Uno K, Takano M, Makita N. Clinical and genetic characteristics of short qt syndrome in japan. The

77th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society.2013年3月16日,Yokohama Japan

11. Harrell DT, Tominaga I, Abe K, Watabe T, Oginosawa Y, Abe H, Sumitomo N, Uno K, Takano M, Makita N. Clinical manifestations and electrophysiological characteristics of K channel mutations responsible for short QT syndrome. Heart Rhythm Society 34th Annual Scientific Sessions.2013年5月9日,Denver USA
12. Harrell DT, Takano M, Uno K, Makita N. Clinical manifestations and electrophysiological characteristics of K channel mutations responsible for short QT syndrome. 第90回日本生理学会大会.2013年3月29日,東京
13. Barc J, Bezzina C, Mizusawa Y, Remme C, Gourraud J, Verkerk A, Schwartz P, Guicheney P, Antzelevitch C, Schulze-Bahr E, Behr E, Tfelt-Hanson J, Kaab S, Watanabe H, Horie M, Makita N, Shimizu W, Froguel P, Roden D, Christoffels V, Gessler M, Wilde A, Probst V, Schott JJ, Dina C, Redon R. Genome-wide association analysis identifies 3 common variants predisposing to Brugada syndrome, a rare disease with high risk of sudden cardiac death. American Heart Association Scientific Sessions 2013.2013年11月18日,Dallas, Texas

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)
野上昭彦 (横浜労災病院)
渡辺一郎 (日本大学)