

能解析の3者に精通した臨床研究医が、ゲノム解析に適した臨床レジストリ、循環器専門基礎解析、生化学的探索を協同実施できる総合力のある循環器ゲノム解析拠点が必要である。

B. 研究方法

1. ゲノム解析の基礎研究と臨床実用化

1) 遺伝性心血管疾患の原因同定の為の、既知・未知遺伝子解析のための環境整備とゲノム解析の実施

各遺伝子解析研究機関におけるゲノム解析を実施するためのオーダーシステムの構築と、その運用を目指す。さらにオーダーのみならず、同遺伝子解析研究システムを用いて、セキュアな環境で解析情報をフィードバックすることができる情報参照サーバーシステムの将来的構築も目指す。解析結果の報告フォーマットの作成と、臨床現場への遺伝子情報の還元するシステムの全国普及を目指す。

遺伝子解析に適合する症例のリスト化と臨床情報と遺伝子変異情報を蓄積し、原因検索の為の遺伝子解析へとつなげる環境を整備する。将来的には病態経過、薬効評価とも連結させ診療最適化に有用な付加価値あるゲノム情報を提供する。

2) 遺伝子機能解析による原因同定とその応用

疾患原因となる変異検索のため、既知遺伝子解析または既知遺伝子変異を除外した症例を中心に、全エクソーム解析を実施し、新規遺伝子変異の同定を試みる。候補化される未

知遺伝子変異に対して分子機能解析を実施し、責任遺伝子変異としての検証を行う。

ゲノム配列・情報解析から得られた情報をもとに、細胞機能、蛋白相互作用、生体機能、分子イメージングに至る一連の機能解析を実施し着目した遺伝子の分子機能を解析する。

3) 北陸地方の肥大型心筋症の登録観察研究

北陸地方を中心として、肥大型心筋症患者を対象として多施設共同レジストリーデータベースを構築し、その臨床像、遺伝子型と臨床表現型との関連、治療内容とともに予後を明らかにする。

2. 倫理的遵守事項

患者情報の解析に関しては施設の倫理委員会の承認を得た上、臨床研究倫理指針を遵守し慎重におこなう。その上で患者とは個別に、医師が書面に示した計画書を明示し、十分説明をしたうえで承諾を得たもののみを本研究に使用する。特に以下の点に留意する。

1) 試料提供者の個人識別情報を含む情報の保護：診療情報を含めた個人情報と検体とは徹底した匿名化を行い、遺伝情報と個人情報の連結は個人識別情報管理者のみが可能となるように個人識別情報管理者をおいて情報を管理する。

2) 試料提供者に対する予想される危険や不利益およびそれらが生じた場合の措置：心筋生検試料採取は通常の診療の際に医学的必要性に応じて行われたもののうち、診療に用いない残余検体を利用することとし、危険や不利益はないと考える。誤って遺伝情報が外部に漏洩した場合、就職・結婚・保険への加入等

に関して不利益をこうむる可能性が考えられるため、これを防ぐために、個人識別情報管理者を置き、同管理者は試料の匿名化を行うとともに個人情報情報を厳重に管理・保管し、試料提供者のプライバシーを保護する。

3) 試料提供者から採取した生体材料の取り扱いについて：提供された試料は、個人識別情報管理者が連結匿名化し、匿名化ラベルのみ貼って保存する。これらの試料は、生体試料の包括利用同意を得ており、本研究だけでなく、将来倫理委員会で承認された他の自主臨床研究についても用いることが可能である。したがって検査済みの試料は、適宜連結可能匿名化番号を含む検体等を完全に削除した上で廃棄するが、使用可能な残余検体は匿名化されたまま施錠された保管場所で保管される。また、特に研究成果として得られた情報の管理には、外部に漏洩しないように対策を行う。

4) 動物実験においても愛護上の問題点を考慮の上、施設の審査結果を本研究について得た。この倫理規定にのっとり動物愛護上の配慮を十分行って実験をおこなう。

C. 研究結果

1. ゲノム解析の基礎研究と臨床実用化

1) 遺伝性心血管疾患の原因同定の為の、既知・未知遺伝子解析のための環境整備とゲノム解析の実施

ヒトゲノム倫理計画書に関しては、既知遺伝子パネル解析、全エクソーム解析、情報解析を行う施設と共同研究施設として計画書に加え、共通の解析が各施設で一様に実施運用可能なように体制構築に関する検討を行った。

症例から、同意取得、ゲノム抽出、既知遺伝子解析、情報解析ののち、未知変異が疑われる症例に対して実施する全エクソーム解析に至るまで、症例エントリーから共通パイプラインを用いて変異同定を目指す一連の流れを、分担研究者間で共有できる共通システムを開発し、研究班全体で検出したバリエーション情報も共有管理できるようなシステムの構築を行う事となった（資料1：2014年7月班会議資料）。

2) 遺伝子機能解析による原因同定と応用

家族歴を有する心血管疾患（肥大型心筋症、拡張型心筋症、不整脈原性右室心筋症、QT延長症候群、Brugada 症候群、特発性心室細動、家族性心房細動、洞不全症候群、房室ブロック、心房中隔欠損症、とそれに類似する病態を有するゲノム解析対象症例の蓄積を行った。そのうち13症例のサンプルについては、既知遺伝子パネル解析を、3症例のサンプルについては、全エクソーム解析を実施した。

症例提供協力施設も倫理委員会承認を得て、豊富な症例登録環境となった。全エクソーム解析を実施した症例については、新規遺伝子変異の同定を試みている。さらにそれら幾つかは現在候補化された未知遺伝子変異に対して分子機能解析を開始し、責任遺伝子変異としての検証を行っている。

D. 結論

従来の遺伝性心血管疾患のバリエーションデータベースの構築により、臨床遺伝子診断が可能な疾患を早期に整理し、臨床診断と遺伝子解析研究の境界を明確にし、両者実施の環境整備を実現することが急務である。

その為には、本事業で開発を目指す「全国普及を目指すゲノム情報解析システム」の実現が必要である。具体的には、① 難病の原因究明と、創薬開発の推進（難治疾患克服）、② 全国循環器遺伝子解析機関ネットワーク構築（難病医療支援ネットワークへの連携）、③ 生体試料バンク、ゲノムデータベース事業への症例提供、④ 早期診断、先制医療の実現、診療ガイドライン改訂、医療費低減、予後改善を目指す臨床研究への情報提供が必要である。

実際に今年度は、循環器疾患の特殊性を理解した汎用性ある研究システムの構築するため、

- ①臨床病態診断
- ②ゲノム解析
- ③原因同定
- ④情報返却、

を主とした事業を実施したが、それらの一体化した解析拠点の実現により、運用ノウハウは一般施設へ汎用性を以て提供される予定である。

さらに長期的視点および発展的事業として、

- ① 本邦発の循環器創薬治療薬開発、② 遺伝子情報解析システム開発、③ ゲノム解析技術と人材の育成、倫理啓蒙活動、ゲノム研究従事者の技術水準向上などのプロジェクトも同時に推進する必要がある。

分子遺伝学的なアプローチを用いた難治性循環器疾患の病態研究において、心機能障害惹起に関与する分子について様々な検討が行われてきた。また従来、臨床遺伝学的アプローチによっても多くの遺伝子変異の同定がなされ、それら分子の病態形成における役割が明らかとなってきた。最新のゲノム解析技術はさらに新たな遺伝子変異の発見を加速し、先進的な分子生物学的手法の導入は詳細な分子

機能解析を可能にした。その結果、病態機序解明に役立てるだけでなく臨床に還元できる橋渡しの研究も実現可能な時代となった。臨床病態の原因鑑別のため遺伝子変異を同定し、症例毎に病因をつきとめることも可能な時代において、正確な原因同定と情報の利活用は診療の適正化と、基礎的にも心不全の病態の正しい理解につながり、新しい診断法治療法の開発など今までにない展開も期待できる。それら実現に最も重要なことの一つに、ゲノム情報解析系の統一であり解析して得た情報を有効的に共有利活用できるよう、新しい時代の研究システムが構築されることが望まれる。

E. 研究発表

1、論文発表

（英文原著）

- 1) Nomura A, Konno T, Fujita T, Tanaka Y, Nagata Y, Tsuda T, Hodatsu A, Sakata K, Nakamura H, Kawashiri MA, Fujino N, Yamagishi M, Hayashi K. Fragmented QRS Predicts Heart Failure Progression in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ J*. 2014 Dec 25;79(1):136-43.
- 2) Hodatsu A, Konno T, Hayashi K, Funada A, Fujita T, Nagata Y, Fujino N, Kawashiri MA, Yamagishi M. Compound heterozygosity deteriorates phenotypes of hypertrophic cardiomyopathy with founder MYBPC3 mutation: evidence from patients and zebrafish models. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014 Dec 1;307(11):H1594-604

- 3) Fujita T, Fujino N, Anan R, Tei C, Kubo T, Doi Y, Kinugawa S, Tsutsui H, Kobayashi S, Yano M, Asakura M, Kitakaze M, Komuro I, Konno T, Hayashi K, Kawashiri MA, Ino H, Yamagishi M. Sarcomere gene mutations are associated with increased cardiovascular events in left ventricular hypertrophy: results from multicenter registration in Japan. *JACC Heart Fail.* 2013 Dec;1(6):459–66.
 - 4) Konno T, Hayashi K, Fujino N, Nagata Y, Hodatsu A, Masuta E, Sakata K, Nakamura H, Kawashiri MA, Yamagishi M. High sensitivity of late gadolinium enhancement for predicting microscopic myocardial scarring in biopsied specimens in hypertrophic cardiomyopathy. *PLoS One.* 2014 Jul 7;9(7):e101465.
 - 5) Current perspectives in genetic cardiovascular disorders: from basic to clinical aspects. Kawashiri MA, Hayashi K, Konno T, Fujino N, Ino H, Yamagishi M. *Heart Vessels.* 2014 Mar;29(2):129–41.
 - 6) 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.
- (和文業績)
- 1) 林 研至
家族性心房細動 循環器内科 Vol 75: 499–507, 2014
- ## 2、学会発表
- 1) Hayashi K, Fujino N, Konno T, Hodatsu A, Tsuda T, Tanaka Y, Kawashiri M, Ino H, Yamagishi M. Functional Characterization of Rare Variants Associated with Lone Atrial Fibrillation. *ESC CONGRESS 2014*, September 02, 2014, Barcelona, Spain.
 - 2) Konno T, Hayashi K, Fujino N, Nagata Y, Hodatsu A, Masuta E, Sakata K, Nakamura H, Kawashiri MA, Yamagishi M. High sensitivity of late gadolinium enhancement for predicting microscopic myocardial scarring in biopsied specimens in hypertrophic cardiomyopathy. *ESC CONGRESS 2014*, September 02, 2014, Barcelona, Spain.
 - 3) Hodatsu A, Konno T, Hayashi K, Fujita T, Nagata Y, Fujino N, Kawashiri M, Yamagishi M. A founder mutation of the myosin binding protein-C gene in hypertrophic cardiomyopathy and adverse outcomes with compound heterozygosity. *ESC CONGRESS 2014*, September 02, 2014, Barcelona, Spain.
 - 4) Nagata Y, Konno T, Yamagishi M. Right ventricular hypertrophy as a determinant for clinical severity in hypertrophic cardiomyopathy: evidence from magnetic resonance imaging. *ESC CONGRESS 2014*, September 02, 2014, Barcelona, Spain.
 - 5) Tsuda T, Hayashi K, Tanaka Y, Nomura A, Nagata Y, Hodatsu A, Fujita T, Konno T, Sakata K, Fujino N, Kawashiri M, Yamagishi M. Prevalence and Prognostic Value of Early Repolarization, J Wave, in Hypertrophic Cardiomyopathy. *ESC CONGRESS 2014*, September 02, 2014, Barcelona, Spain.

F. 知的財産権の出願・登録状況
(予定も含む)

1、特許取得
なし

2、実用新案登録
なし

3、その他
以上、特筆すべき事項なし

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患等実用化研究事業）

委託業務成果報告（業務報告）

遺伝性心血管疾患における集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究

研究分担者 堀江 稔 滋賀医科大学 医学部内科学講座 教授

（研究協力者 大野 聖子 滋賀医科大学 アジア疫学センター 特任講師）

研究要旨

遺伝性心血管疾患は一つの臨床病型に数多くの候補遺伝子が含まれており、循環器難病の原因同定に際して症例間比較が困難であることが多く、循環器分野独特の解析戦略が必要である。かかる特性を加味しながら循環器遺伝難病のゲノム解析拠点形成のため、既知遺伝子の臨床診断応用、新規原因遺伝子同定に両者に重点を置き、大家系に対する遺伝子同定はもとより、少数症例解析に対応した情報解析システムを開発する。

全国循環器ゲノム解析ネットワークを構成するため、難治性疾患研究班、日本循環器各学会に属する研究各施設が分担となり、遺伝子情報の臨床現場への還元と診療ガイドラインへの反映するための臨床研究チームを構築する。とりわけ「臨床情報・迅速生体機能・相互作用分子探索」、原因同定に欠かせない3つの重要機能解析をゲノム解析と同時に実施できる研究基盤を整えた施設が協同し、創薬開発への発展性を高めた事業を展開する。

研究班で同定した新規原因遺伝子については創薬開発に資するシーズ探索を行うとともに、生体試料、臨床情報からしか入手できないアノテーションを情報解析に付加し汎用性の高い循環器ゲノムデータベースを作成する。最新のセキュアな情報管理システムの下に、一般研究班に迅速に情報を還元するシステム技術の開発を行う。

以上の業務を行う事で、難病遺伝子解析における標的シーズの同定と創薬開発に向けた取り組み、原因遺伝子同定による精密な疾患分類の実現、早期診断と治療最適化は、重症化予防医療の実現を目指す。

A. 研究目的

ゲノム解析を要する循環器難病患者は数～十万人と非常に多く、原因遺伝子と臨床病型が1対1ではない拡張型心筋症は50種を超える遺伝子が同定されるも、未だ7割以上が原因遺伝子未同定である。精細な病因分類ができず治療の選択肢は乏しく、病態重症化と高度医療が不可避である。

難病克服のため全国規模の循環器ゲノム解析ネットワークの上に、ゲノム医学に精通する臨床研究医が戦略的に解析を実施し疾患 rare variant の同定を行い、臨床現場に遺伝子情報を還元する必要がある。

少子・核家族化のため家系内の全エクソン解析による遺伝子同定は完結しないため、①ゲノム解析、②臨床病態診断、③未知遺伝子機能解析の3者に精通した臨床研究医が、ゲノ

ム解析に適した臨床レジストリ、循環器専門基礎解析、生化学的探索を協同実施できる総合力のある循環器ゲノム解析拠点が必要である。

B. 研究方法

1. ゲノム解析の基礎研究と臨床実用化

1) 遺伝性心血管疾患の原因同定の為の、既知・未知遺伝子解析のための環境整備とゲノム解析の実施

各遺伝子解析研究機関におけるゲノム解析を実施するためのオーダーシステムの構築と、その運用を目指す。さらにオーダーのみならず、同遺伝子解析研究システムを用いて、セキュアな環境で解析情報をフィードバックすることができる情報参照サーバーシステムの将来的構築も目指す。解析結果の報告フォーマットの作成と、臨床現場への遺伝子情報の還元するシステムの全国普及を目指す。

臨床病院へ迅速にゲノム診断を提供するためのシステムを構築する。そのため既知遺伝子変異を検出するため、Agilent 社 Haloplex または Illumina 社の TruSeq custom amplicon kit を基本にした既知遺伝子スクリーニングパネル（不整脈疾患：46 遺伝子に対応）を標準的に用い、循環器疾患特異的な既知遺伝子解析を実施する。

遺伝子解析に適合する症例のリスト化と臨床情報と遺伝子変異情報を蓄積し、原因検索の為の遺伝子解析へとつなげる環境を整備する。将来的には病態経過、薬効評価とも連結させ診療最適化に有用な付加価値あるゲノム情報を提供する。

2) 遺伝子機能解析による原因同定とその応用

疾患原因となる変異検索のため、既知遺伝子解析または既知遺伝子変異を除外した症例を中心に、全エクソーム解析を実施し、新規遺伝子変異の同定を試みる。候補化される未知遺伝子変異に対して分子機能解析を実施し、責任遺伝子変異としての検証を行う。

ゲノム配列・情報解析から得られた情報をもとに、細胞機能、蛋白相互作用、生体機能、分子イメージングに至る一連の機能解析を実施し着目した遺伝子の分子機能を解析する。

2. 倫理的遵守事項

患者情報の解析に関しては施設の倫理委員会の承認を得た上、臨床研究倫理指針を遵守し慎重におこなう。その上で患者とは個別に、医師が書面に示した計画書を明示し、十分説明をしたうえで承諾を得たもののみを本研究に使用する。特に以下の点に留意する。

1) 試料提供者の個人識別情報を含む情報の保護：診療情報を含めた個人情報と検体とは徹底した匿名化を行い、遺伝情報と個人情報の連結は個人識別情報管理者のみが可能となるように個人識別情報管理者において情報を管理する。

2) 試料提供者に対する予想される危険や不利益およびそれらが生じた場合の措置：心筋生検試料採取は通常の診療の際に医学的必要性に応じて行われたもののうち、診療に用いない残余検体を利用することとし、危険や不利益はないと考える。誤って遺伝情報が外部に漏洩した場合、就職・結婚・保険への加入等

に関して不利益をこうむる可能性が考えられるため、これを防ぐために、個人識別情報管理者を置き、同管理者は試料の匿名化を行うとともに個人情報情報を厳重に管理・保管し、試料提供者のプライバシーを保護する。

3) 試料提供者から採取した生体材料の取り扱いについて：提供された試料は、個人識別情報管理者が連結匿名化し、匿名化ラベルのみ貼って保存する。これらの試料は、生体試料の包括利用同意を得ており、本研究だけでなく、将来倫理委員会で承認された他の自主臨床研究についても用いることが可能である。したがって検査済みの試料は、適宜連結可能匿名化番号を含む検体等を完全に削除した上で廃棄するが、使用可能な残余検体は匿名化されたまま施錠された保管場所で保管される。また、特に研究成果として得られた情報の管理には、外部に漏洩しないように対策を行う。

4) 動物実験においても愛護上の問題点を考慮の上、施設の審査結果を本研究について得た。この倫理規定にのっとり動物愛護上の配慮を十分行って実験をおこなう。

C. 研究結果

1. ゲノム解析の基礎研究と臨床実用化

1) 遺伝性心血管疾患の原因同定の為の、既知・未知遺伝子解析のための環境整備とゲノム解析の実施

ヒトゲノム倫理計画書に関しては、既知遺伝子パネル解析、全エクソーム解析、情報解析を行う施設と共同研究施設として計画書に加え、共通の解析が各施設で一様に実施運用可能なように体制構築に関する検討を行った。

症例から、同意取得、ゲノム抽出、既知遺伝子解析、情報解析ののち、未知変異が疑われる症例に対して実施する全エクソーム解析に至るまで、症例エントリーから共通パイプラインを用いて変異同定を目指す一連の流れを、分担研究者間で共有できる共通システムを開発し、研究班全体で検出したバリエーション情報も共有管理できるようなシステムの構築を行う事となった（資料1：2014年7月班会議資料）。

臨床における疾患既知遺伝子変異を検出する迅速な臨床ゲノム診断を将来提供するためのシステムを構築する取り組みを行った。Agilent社 Haloplex または Illumina 社の TruSeq custom amplicon kit を基本にした既知遺伝子スクリーニングパネル（不整脈疾患：46遺伝子に対応）を標準的に用いることができるようにシステムの構築を行う事で、遺伝性心血管症例に対する、既知遺伝子変異の同定するシステムが整った。

パイプラインの開発およびバリエーションデータベースの開発を行い、パネル解析と全エクソーム解析の解析精度の検証を行うため、初年度の症例については、一定数の症例に対して一律にパネル解析と全エクソーム解析の両者を実施し、将来的に次世代解析技術を循環器領域における遺伝子診断に利用するための基本情報について、年度末までに解析が終了するデータを用いてデータベース化作業をおこなっている。

2) 遺伝子機能解析による原因同定と応用

不整脈疾患、とそれに類似する病態を有するゲノム解析対象症例の蓄積を行った。そのうち300症例のサンプルについては、既知遺伝子パネル解析を実施した。

症例提供協力施設も倫理委員会承認を得て、豊富な症例登録環境となった。全エクソーム解析を実施した症例については、新規遺伝子変異の同定を試みている。さらにそれら幾つかは現在候補化された未知遺伝子変異に対して分子機能解析を開始し、責任遺伝子変異としての検証を行っている。

D. 結論

従来の遺伝性心血管疾患のバリエーションデータベースの構築により、臨床遺伝子診断が可能な疾患を早期に整理し、臨床診断と遺伝子解析研究の境界を明確にし、両者実施の環境整備を実現することが急務である。

その為には、本事業で開発を目指す「全国普及を目指すゲノム情報解析システム」の実現が必要である。具体的には、① 難病の原因究明と、創薬開発の推進（難治疾患克服）、② 全国循環器遺伝子解析機関ネットワーク構築（難病医療支援ネットワークへの連携）、③ 生体試料バンク、ゲノムデータベース事業への症例提供、④ 早期診断、先制医療の実現、診療ガイドライン改訂、医療費低減、予後改善を目指す臨床研究への情報提供が必要である。

実際に今年度は、循環器疾患の特殊性を理解した汎用性ある研究システムの構築するため、

- ①臨床病態診断
- ②ゲノム解析
- ③原因同定
- ④情報返却、

を主とした事業を実施したが、それらの一体化した解析拠点の実現により、運用ノウハウは一般施設へ汎用性を以て提供される予定である。

さらに長期的視点および発展的事業として、

- ① 本邦発の循環器創薬治療薬開発、② 遺伝子情報解析システム開発、③ ゲノム解析技術と人材の育成、倫理啓蒙活動、ゲノム研究従事者の技術水準向上などのプロジェクトも同時に推進する必要がある。

分子遺伝学的なアプローチを用いた難治性循環器疾患の病態研究において、心機能障害惹起に関与する分子について様々な検討が行われてきた。また従来、臨床遺伝学的アプローチによっても多くの遺伝子変異の同定がなされ、それら分子の病態形成における役割が明らかとなってきた。最新のゲノム解析技術はさらに新たな遺伝子変異の発見を加速し、先進的な分子生物学的手法の導入は詳細な分子機能解析を可能にした。その結果、病態機序解明に役立てるだけでなく臨床に還元できる橋渡しの研究も実現可能な時代となった。臨床病態の原因鑑別のため遺伝子変異を同定し、症例毎に病因をつきとめることも可能な時代において、正確な原因同定と情報の利活用は診療の適正化と、基礎的にも心不全の病態の正しい理解につながり、新しい診断法治療法の開発など今までにない展開も期待できる。それら実現に最も重要なことの一つに、ゲノム情報解析系の統一であり解析して得た情報を有効的に共有利活用できるよう、新しい時代の研究システムが構築されることが望まれる。

E. 研究発表

1、論文発表

（英文原著）

- 1) Hasegawa K, Ohno S, Ashihara T, Itoh H, Ding WG, Toyoda F, Makiyama T, Aoki H,

- Nakamura Y, Delisle BP, Matsuura H, Horie M. A novel KCNQ1 missense mutation identified in a patient with juvenile-onset atrial fibrillation causes constitutively open IKs channels. *Heart Rhythm* 11(1): 67–75, 2014.
- 2) Kato K, Makiyama T, Wu J, Ding WG, Kimura H, Naiki N, Ohno S, Itoh H, Nakanishi T, Matsuura H, Horie M. Cardiac Channelopathies Associated With Infantile Fatal Ventricular Arrhythmias, From The Cradle to The Bench. *J Cardiovasc Electrophysiol* 25(1): 66–73, 2014.
 - 3) Wang Q, Ohno S, Ding WG, Fukuyama M, Miyamoto A, Itoh H, Makiyama T, Wu J, Bai J, Hasegawa K, Shinohara T, Takahashi N, Shimizu A, Matsuura H, Horie M. Gain-of-Function KCNH2 Mutations in Patients with Brugada Syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 25(5):522–530, 2014
 - 4) 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* 16(11):1646–1654, 2014
 - 5) Kokunai Y, Nakata T, Furuta M, Sakata S, Kimura H, Aiba T, Yoshinaga M, Osaki Y, Nakamori M, Itoh H, Sato T, Kubota T, Kadota K, Shindo K, Mochizuki H, Shimizu W, Horie M, Okamura Y, Ohno K, Takahashi MP. A Kir3.4 mutation causes Andersen-Tawil syndrome by an inhibitory effect on Kir2.1. *Neurology*. 82(12):1058–1064, 2104
 - 6) Zhou J, Ding WG, Makiyama T, Miyamoto A, Matsumoto Y, Kimura H, Tarutani Y, Zhao J, Wu J, Zang WJ, Matsuura H, Horie M. A Novel HCN4 Mutation, G1097W, is associated with atrioventricular block. *Circulation Journal*. 78(4): 938–942, 2014
 - 7) Araki A, Katsuno M, Suzuki K, Banno H, Suga N, Hashizume A, Mano T, Hijikata Y, Nakatsuji H, Watanabe H, Makiyama T, Ohno S, Fukuyama M, Morimoto S, Horie M, Sobue G. Brugada syndrome in spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). *Neurology* 82(20):1813–1821, 2014
 - 8) Hisamatsu T, Miura K, Ohkubo T, Yamamoto T, Fujiyoshi A, Miyagawa N, Kadota A, Takashima N, Okuda N, Yoshita K, Kita Y, Murakami Y, Nakamura Y, Okamura T, Horie M, Okayama A, Ueshima H, NIPPON DATA80 Research Group. High long-chain n-3 fatty acid intake attenuates the effect of high resting heart rate on cardiovascular mortality risk: A 24-year follow-up of Japanese general population. *Journal of Cardiology*. 64(3):218–224, 2014
 - 9) Katsuumi 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. *International journal of cardiology* ;172(2):519–522, 2014
 - 10) Wu J, Naiki N, Ding WG, Ohno S, Kato K, Zang WJ, Delisle BP, Matsuura H, Horie M. A molecular mechanism for adrenergic-induced long QT Syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 63(8):819–827, 2014
 - 11) Yoshinaga M, Kucho Y, Sarantuya J, Ninomiya Y, Horigome H, Ushinohama H, Shimizu W, Horie M. Genetic characteristics of children and adolescents with long QT syndrome diagnosed by school-based electrocardiographic screening programs. *Circulation Arrhythmia and Electrophysiol* 7(1): 107–112, 2014

- 12) Bartos DC, Giudicessi JR, Tester DJ, Ackerman MJ, Ohno S, Horie M, Gollob MH, Burgess DE, Delisle BP. A KCNQ1 Mutation Contributes to the Concealed Type 1 Long QT Phenotype by Limiting the Kv7.1 Channel Conformational Changes Associated with PKA Phosphorylation. *Heart Rhythm* 11(3): 459-468, 2014
 - 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* 29(3):422-426, 2014
 - 14) Hasegawa K, Ohno S, Itoh H, Makiyama T, Aiba T, Nakano Y, Shimizu W, Matsuura H, Horie M. A rare KCNE1 polymorphism, D85N, as a genetic modifier of long QT syndrome. *Journal of Arrhythmia* 30(3):161-166, 2014
 - 15) Watanabe E, Tanabe T, Osaka M, Chishaki A, Takase B, Niwano S, Watanabe I, Sugi K, Katoh T, Takayanagi K, Mawatari K, Horie M, Okumura K, Inoue H, Atarashi H, Yamaguchi I, Nagasawa S, Moroe K, Kodama I, Sugimoto T, Aizawa Y. Sudden cardiac arrest recorded during Holter monitoring: Prevalence, antecedent electrical events, and outcomes. *Heart Rhythm* 11(8):1418-1425, 2014
 - 16) Kaneko Y, Horie M, Niwano S, Kusano K, Takatsuki S, Kurita T, Mitsuhashi T, Nakajima T, Irie T, Hasegawa K, Noda T, Kamakura S, Aizawa Y, Yasuoka R, Torigoe K, Suzuki H, Ohe T, Shimizu A, Fukuda K, Kurabayashi M, Aizawa Y. Electrical Storm in Patients with Brugada syndrome is Associated with Early Repolarization. *Circulation Arrhythmia and Electrophysiology*. 7(6): 1122-1128, 2014
 - 17) Aizawa Y, Sato M, Ohno S, Horie M, Takatsuki S, Fukuda K, Chinushi M, Usui T, Aonuma K, Hosaka Y, Haissaguerre M, Aizawa Y. Circadian Pattern of Fibrillatory Events in non-Brugada-Type Idiopathic Ventricular Fibrillation with a Focus on J waves. *Heart Rhythm* 11(12): 2261-2266, 2014
 - 18) Taniguchi T, Shiomi H, Toyota T, Morimoto T, Akao M, Nakatsuma K, Ono K, Makiyama T, Shizuta S, Furukawa Y, Nakagawa Y, Ando K, Kadota K, Horie M, Kimura T. Effect of Preinfarction Angina Pectoris on Long-term Survival in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction Who Underwent Primary Percutaneous Coronary Intervention. *Am J Cardiol*. 114(8): 1179-1186, 2014
 - 19) Mizusawa Y, Horie M, Wilde AA. Genetic and Clinical Advances in Congenital Long QT Syndrome. *Circ J*. 78(12): 2827-2833, 2014
- (和文業績)
- 1) 堀江 稔: 薬物誘発性不整脈. *心臓*. 46(3): 318-321, 2014
 - 2) 木村 剛, 北 徹, 堀江 稔, 堀内久徳, 尾野 亘, 牧山 武, 吉田善紀: 致死性不整脈症候群の病態解明に関する研究 臨床・基礎研究(ヒト疾患特異的人工多能性幹(iPS)細胞を用いた解析) *医科学応用研究財団研究報告* 31:447-454, 2014
 - 3) 長谷川奏恵, 大野聖子, 川村美朋子, 道智賢市, 芦原貴司, 伊藤英樹, 林 秀樹, 伊藤 誠, 堀江 稔: カテコラミン誘発性多形性心室頻拍の重症化に関する遺伝的修飾因子 KCNE1 D85N *滋賀医学* 36: 83, 2014
 - 4) 藤澤祐介, 林 泰佑, 進藤考洋, 平田陽一郎, 犬塚 亮, 清水信隆, 岡 明, 堀江 稔: QT 延長症候群に対する遺伝子検査の有用性 *日本小児科学会雑誌* 118(7): 1146, 2014

- 5) 堀江 稔：遺伝性不整脈の診断とマネージメントの Up-to-Date—3大陸不整脈学会 Expert Consensus Statement を中心に。呼吸と循環. 62(9)：832-840, 2014

2、学会発表

- 1) Hasegawa K, Watanabe H, Ohno S, Itoh H, Makiyama T, Ashihara T, Hayashi H, Horie M. The High Prevalence of Early Repolarization in Genotyped Long QT Syndrome 第 78 回日本循環器学会総会・学術集会 (2014. 03. 21-23 東京)
- 2) Ohno S, Hasegawa K, Fukuyama M, Makiyama T, Horie M. Benchtop Next Generation Sequencer has Facilitated the Genetic Analysis for Inherited Arrhythmias. 第 78 回日本循環器学会総会・学術集会 (2014. 03. 21-23 東京)
- 3) Ohno S. Genetic analysis for inherited arrhythmias using benchtop next generation sequencer. International Research Symposium on Inherited Arrhythmias 2014(2014. 03. 22, Tokyo, Japan)
- 4) Miyamoto K, Aiba T, Kimura H, Hayashi H, Nakajima I, Ishibashi K, Okamura H, Noda T, Kamakura S, Kusano K, Horie M, Shimizu W. Electrocardiographic Characteristic of Flecainide Therapy for Ventricular Arrhythmia in Patients with Andersen-Tawil Syndrome with KCNJ2 Mutation. Heart Rhythm 2014(2014. 05. 06-11, San Francisco, Ca, U. S. A)
- 5) Hasegawa K, Ohno S, Kimura H, Itoh H, Makiyama T, Yoshida Y, Horie M. Mosaic KCNJ2 Mutation in Andersen-Tawil syndrome: Targeted Deep Sequencing is Useful for the Detection of Mosaicism. Heart Rhythm 2014(2014. 05. 06-11, San Francisco, Ca, U. S. A)
- 6) Pedrazzini M, Itoh H, Crotti L, Aiba T, Denjoy I, Fressart V, Hayashi K, Nakajima T, Ohno S, Makiyama T, Wu J, Hasegawa K, Mastantuono E, Dagradi F, Yamagishi M, Berthet M, Shimizu W, Guicheney P, Schwartz PJ, Horie M. Genetics in acquired long QT syndrome. ESHG 2014 (2014. 5. 31-6. 3, Milano, Italy)
- 7) Hayano M, Makiyama T, Sasaki K, Yamamoto Y, Harita T, Nishiuchi S, Wuriyanghai Y, Ohno S, Horie M, Kimura T. Cardiac sodium channel gene mutations associated with dilated cardiomyopathy. ESC CONGRESS 2014(2014. 8. 30-9. 3, Barcelona, Spain)
- 8) Wang Q, Ohno S, Fukuyama M, Sasaki K, Makiyama T, Horie M. A novel SCN4B intronic variant identified in patients with Brugada syndrome and idiopathic ventricular fibrillation caused an exon skipping. ESC CONGRESS 2014(2014. 8. 30-9. 3, Barcelona, Spain)
- 9) Ohno S, Fukuyama M, Itoh H, Makiyama T, Horie M. Identification of latent mutations in primary inherited arrhythmia syndromes using benchtop next generation sequencer. ESC CONGRESS 2014(2014. 8. 30-9. 3, Barcelona, Spain)
- 10) Ohno S, Fukuyama M, Itoh H, Makiyama T, Horie M. High frequency of ANK2 mutations in patients with non-genotyped primary inherited arrhythmia syndromes. ESC CONGRESS 2014(2014. 8. 30-9. 3, Barcelona, Spain)
- 11) Fukuyama M, Ohno S, Makiyama T, Hasegawa K, Itoh H, Horie M. Identification of novel SCN10A variants in Brugada syndrome patients. ESC CONGRESS 2014(2014. 8. 30-9. 3, Barcelona, Spain)
- 12) Ohno S, Kawamura M, Hasegawa K, Horie M. Gender differences in the inheritance mode of RYR2 mutations in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia patients. ESC

CONGRESS 2014(2014. 8. 30-9. 3,
Barcelona, Spain)

- 13) 藤居祐介、伊藤英樹、芦原貴司、八木典章、酒井 宏、堀江 稔、中川義久 : Short-coupled Variant of Torsade de Pointes の遺伝学的検討 第62回日本心臓病学会学術集会 (2014. 09. 26-28 仙台)
- 14) Wang Q, Ohno S, Ding WG, Bai J, Makiyama T, Matsuura H, Horie M. Functional analysis of a novel KCNH2 Mutation identified in Familial Short QT Syndrome. CES meeting 2014(2014. 11. 15, Chicago, IL, U.S.A.)
- 15) Ozawa J, Ohno S, Itoh H, Makiyama T, Horie M. Young long QT syndrome patients with KCNH2 mutations have late onset but severe symptoms. AHA Scientific Sessions 2014(2014. 11. 15-19, Chicago, IL, U.S.A.)
- 16) Kato K, Ohno S, Makiyama T, Horie M. LMNA Cardiomyopathy Mimicking Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. AHA Scientific

Sessions 2014(2014. 11. 15-19, Chicago, IL, U.S.A.)

- 17) Kimura H, Itoh H, Ohno S, Fukuyama M, Kato K, Ichikawa M, Fujii Y, Makiyama T, Horie M. The Prognosis of Andersen-Tawil syndrome is not so benign as ever thought. AHA Scientific Sessions 2014(2014. 11. 15-19, Chicago, IL, U.S.A.)

F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

1、特許取得

なし

2、実用新案登録

なし

3、その他

以上、特筆すべき事項なし

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患等実用化研究事業）

委託業務成果報告（業務報告）

遺伝性心血管疾患における集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究
「エピネフリン負荷QT延長症例にて検出されたSCN5A遺伝子C末変異の機能解析」

研究分担者 木村 剛 京都大学大学院 医学研究科 教授

（研究協力者 牧山 武 京都大学大学院 医学研究科 助教）

研究要旨

心筋唯一の Na チャネルである SCN5A 遺伝子の異常により、多彩な遺伝性不整脈疾患を引き起こすことが知られている。先天性 QT 延長症候群は、原因遺伝子により型分けされ、SCN5A 遺伝子によるもの(LQT3)は、夜間・安静時に心室性不整脈を来しやすいことが知られている。我々は、エピネフリン負荷にて QT 延長を認めた症例において SCN5A 遺伝子の最後のアミノ酸を変える V2016M 変異を検出し、変異チャネルの電気生理学的機能解析を行った。野生型に比べて変異チャネルはピーク Na 電流量の低下を認め、徐脈に合致する所見であった。また、チャネルキネティクスに関しては、ベースラインでは明らかな変化を認めなかったが、PKA 刺激で、late Na 電流が増加し、PKA, PKC 刺激においてチャネルの不活性化の障害を認める機能亢進の所見を認めた。以上の結果は、エピネフリン負荷にて QT 延長を来す atypical な LQT3 のメカニズムを示唆する所見であると考えられる。

A. 研究目的

先天性 QT 延長症候群は、原因遺伝子により型分けされ、運動・エピネフリン負荷時に QT 延長、心室性不整脈を来す症例は KCNQ1 遺伝子変異による LQT1 に典型的であり、SCN5A 遺伝子によるもの(LQT3)は、夜間・安静時に発作を来しやすいとされている。今回我々は、エピネフリン負荷 QT 延長+洞不全症候群症例において SCN5A 遺伝子の最後のアミノ酸を変化させる変異を検出し、本症例の疾患発症メカニズムとの関連を解析した。

B. 研究方法

失神歴のあるエピネフリン負荷 QT 延長+洞不全症候群症例（24 歳男性）において検出さ

れた SCN5A 遺伝子変異(c. 6046 G>A, p. V2016M) に関して、変異を導入したプラスミドを作製し、ヒト胎児腎（HEK）培養細胞に心臓 Na チャネル α サブユニット、 $\beta 1$ サブユニットと共発現させた過剰発現系においてホールセル・パッチクランプ法を用いた電気生理学的機能解析を行った。エピネフリン負荷後の変化をみるために PKA 刺激として、PKA activator : 8-CPT-cAMP、PKG 刺激として、PKG activator : 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) を用いた。

（倫理面への配慮）

本研究は、京都大学医学部の倫理委員会にて承認済みである。

C. 研究結果

パッチクランプ法を用いたNa電流解析の結果、野生型(WT)に比べて変異チャネル(V2016M)はピークNa電流量の低下を認め(WT, 175.2 ± 17.6 pA/pF; V2016M, 97.2 ± 16.0 pA/pF; $p < 0.01$)、臨床所見で見られる徐脈に合致する所見であった。また、チャネルキネティクスに関しては、ベースラインでは明らかな変化を認めなかったが、PKA刺激で、late Na電流が増加し(WT, $0.07 \pm 0.01\%$; V2016M, $0.17 \pm 0.03\%$; $p < 0.05$)、PKA、または、PKC刺激においてチャネルの不活性化の障害を認めた。(WTに比べて、PKC、PKC刺激下でfast inactivationの脱分極側シフト、PKC刺激下でdevelopment of slow inactivation、closed-state inactivationの低下)これらの所見はエピネフリン負荷時のNaチャネル機能亢進を示唆する所見であった。

D. 考察

本研究にて解析したSCN5A-V2016M変異は、ShyらがBrugada症候群患者において報告し、Na電流量低下の機能解析結果を示した(Shy et al. Circulation 2014)。我々は、同じ変異であるが、複雑な表現型を呈する本症例において、PKA、PKC刺激による変化を詳細に検討した。通常、エピネフリン負荷QT延長はLQT1に特徴的な所見であるが、SCN5A変異にても認めうることが示唆された。また、本変異はC末最後のアミノ酸を変化させるPDZドメインに位置する変異であり、チャネル結合タンパク(syntrophin, synapse-associated protein 97 (SAP97), and protein tyrosine phosphatase 1)との関与も今後の検討課題である。

E. 結論

エピネフリン負荷QT延長+洞不全症候群症例にて検出されたSCN5A-V2016M変異の機能解析結果は、atypical LQT3の疾患発症機序

に合致する所見であった。本知見が病態の把握、患者診療への還元が期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 業績

1. 論文発表

- 1) Wang Q, Ohno S, Ding WG, Fukuyama M, Miyamoto A, Itoh H, Makiyama T, Wu J, Bai J, Hasegawa K, Shinohara T, Takahashi N, Shimizu A, Matsuura H, Horie M. Gain-of-function KCNH2 mutations in patients with Brugada syndrome. J Cardiovasc Electrophysiol. 2014 May;25(5):522-30. (査読有)
- 2) Fukuyama M, Wang Q, Kato K, Ohno S, Ding WG, Toyoda F, Itoh H, Kimura H, Makiyama T, Ito M, Matsuura H, Horie M. Long QT syndrome type 8: novel CACNA1C mutations causing QT prolongation and variant phenotypes. Europace. 2014 Apr 12. (査読有)
- 3) Kato K, Makiyama T, Wu J, Ding WG, Kimura H, Naiki N, Ohno S, Itoh H, Nakanishi T, Matsuura H, Horie M. Cardiac channelopathies associated with infantile fatal ventricular arrhythmias: from the cradle to the bench. J Cardiovasc Electrophysiol. 2014 Jan;25(1):66-73.
- 4) Hasegawa K, Ohno S, Kimura H, Itoh H, Makiyama T, Yoshida Y, Horie M. Mosaic KCNJ2 Mutation in Andersen-Tawil syndrome: Targeted Deep Sequencing is Useful for the Detection of Mosaicism. Clin Genet. 2014 Feb 7. (査読有)
- 5) 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 Jan 6. (査読有)
- 6) Zhou J, Ding WG, Makiyama T, Miyamoto A, Matsumoto Y, Kimura H, Tarutani Y, Zhao J, Wu J, Zang WJ, Matsuura H, Horie M. A novel HCN4 mutation, G1097W, is associated with atrioventricular block. *Circ J*. 2014;78(4):938-42. (査読有)
 - 7) Hasegawa K, Ohno S, Ashihara T, Itoh H, Ding WG, Toyoda F, Makiyama T, Aoki H, Nakamura Y, Delisle BP, Matsuura H, Horie M. A novel KCNQ1 missense mutation identified in a patient with juvenile-onset atrial fibrillation causes constitutively open IKs channels. *Heart Rhythm*. 2014 Jan;11(1):67-75. (査読有)
 - 8) 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*. 2014 Jun;7(3):511-7. (査読有)
 - 9) Araki A, Katsuno M, Suzuki K, Banno H, Suga N, Hashizume A, Mano T, Hijikata Y, Nakatsuji H, Watanabe H, Yamamoto M, Makiyama T, Ohno S, Fukuyama M, Morimoto S, Horie M, Sobue G. Brugada syndrome in spinal and bulbar muscular atrophy. *Neurology*. 2014 May 20;82(20):1813-21. (査読有)
 - 10) Higami H, Shiomi H, Niki S, Tazaki J, Imai M, Saito N, Makiyama T, Shizuta S, Shioi T, Ono K, Kimura T. Long-term clinical outcomes after sirolimus-eluting stent implantation for unprotected left main coronary artery disease. *Cardiovasc Interv Ther*. 2014 Sep 7. (査読有)
 - 11) Shiomi H, Morimoto T, Makiyama T, Ono K, Furukawa Y, Nakagawa Y, Kadota K, Onodera T, Takatsu Y, Mitsudo K, Kita T, Sakata R, Okabayashi H, Hanyu M, Komiya T, Yamazaki F, Nishiwaki N, Kimura T; CREDO-Kyoto Investigators. Evolution in practice patterns and long-term outcomes of coronary revascularization from bare-metal stent era to drug-eluting stent era in Japan. *Am J Cardiol*. 2014 May 15;113(10):1652-9. (査読有)
 - 12) Taniguchi T, Shiomi H, Toyota T, Morimoto T, Akao M, Nakatsuma K, Ono K, Makiyama T, Shizuta S, Furukawa Y, Nakagawa Y, Ando K, Kadota K, Horie M, Kimura T. Effect of Preinfarction Angina Pectoris on Long-term Survival in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction Who Underwent Primary Percutaneous Coronary Intervention. *Am J Cardiol*. 2014 Oct 15;114(8):1179-86. (査読有)
 - 13) Goto K, Nakai K, Shizuta S, Morimoto T, Shiomi H, Natsuaki M, Yahata M, Ota C, Ono K, Makiyama T, Nakagawa Y, Furukawa Y, Kadota K, Takatsu Y, Tamura T, Takizawa A, Inada T, Doi O, Nohara R, Matsuda M, Takeda T, Kato M, Shirotani M, Eizawa H, Ishii K, Lee JD, Takahashi M, Horie M, Takahashi M, Miki S, Aoyama T, Suwa S, Hamasaki S, Ogawa H, Mitsudo K, Nobuyoshi M, Kita T, Kimura T; CREDO-Kyoto Registry

- Cohort-2 Investigators. Anticoagulant and antiplatelet therapy in patients with atrial fibrillation undergoing percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol.* 2014 Jul 1;114(1):70-8. (査読有)
- 14) Yano M, Saito N, Watanabe S, Watanabe H, Nishikawa R, Fujino T, Bao B, Yamamoto E, Watanabe H, Nakatsuma K, Imai M, Makiyama T, Sakata Y, Kimura T, Inoue K. First clinical experience of the looped Inoue balloon technique for antegrade percutaneous balloon aortic valvuloplasty. *Heart Vessels.* 2014 Jul 16. (査読有)
2. 学会発表
- 1) 牧山 武: Update in genetics of cardiomyopathy-Laminopathy-, The 7th Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHRS) Scientific Session, Delhi, India, 10.29-11.1, 2014. (invited speaker)
- 2) 牧山 武: Sudden Cardiac Death Risk Assessment Risk Stratification of Patients with Brugada Syndrome, The 7th Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHRS) Scientific Session, Delhi, India, 10.29-11.1, 2014. (invited speaker)
- 3) 早野 護: A novel SCN10A mutation identified in a patient with familial Brugada syndrome, The 7th Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHRS) Scientific Session, Delhi, India, 10.29-11.1, 2014. (poster)
- 4) Yimin Wuriyanghai: Modelling the long-QT syndrome type 1 caused by splicing mutation KCNQ1-A344A with patient-specific induced pluripotent stem-cell, The 7th Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHRS) Scientific Session, Delhi, India, 10.29-11.1, 2014. (poster)
- 5) 西内 英: The Relationship Between the Type of Mutations in lamin A/C Gene and Cardiac Phenotype: Genetic Risk Factor for Dilated Cardiomyopathy, The 7th Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHRS) Scientific Session, Delhi, India, 10.29-11.1, 2014. (poster)
- 6) 山本 雄大: Electrophysiological Characteristics and Transcriptional Profiles in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes During a Long-Term Culture Chicago, USA, 11.15-19, 2014 (poster)
- 7) 西内 英: Lamin A/C-Related Cardiomyopathy Specific Induced-Pluripotent Stem Cells-Derived Cardiomyocytes Stressed by Adrenergic-Stimulation Recapitulate the Aging-Related Phenotype in an Early Phase of Differentiation (abstract poster session)
- 8) 早野 護: Cardiac Na⁺ Channel Gene Mutations associated with Dilated Cardiomyopathy, European Society of Cardiology (ESC) Congress 2014, Barcelona, Spain, 8.30-9.3, 2014. (poster)
- 9) 西内 英: Recapitulation of Lamin A/C-related Cardiomyopathy Using Patient-specific Induced Pluripotent Stem Cells: A Novel Splicing Mutation in the LMNA Gene, European Society of Cardiology (ESC) Congress 2014, Barcelona, Spain, 8.30-9.3, 2014. (poster)
- 10) Yimin Wuriyanghai: Modelling the long-QT syndrome type 1 caused by splicing mutation KCNQ1-A344A with patient-specific induced pluripotent

- stem-cell, European Society of Cardiology (ESC) Congress 2014, Barcelona, Spain, 8.30-9.3, 2014. (poster)
- 11) Yimin Wuriyanghai: Modeling of long-QT syndrome type 1 caused by a splicing mutation using human iPS cells, 第78回日本循環器学会学術集会, 東京, 3.21-23, 2014 (Oral, Featured research session)
 - 12) 西内 英: The Relationship Between the Type of Mutations in Lamin A/C Gene and Cardiac Phenotype-Genetic Risk Factor for Dilated Cardiomyopathy-, 第78回日本循環器学会学術集会, 東京, 3.21-23, 2014 (Oral, Featured research session)
 - 13) 張田 健志: The Association Between the Hereditary Factor of Atrial Fibrillation and the Recurrent Atrial Arrhythmias after Catheter Ablation Therapy, 第78回日本循環器学会学術集会, 東京, 3.21-23, 2014 (Poster)
 - 14) 早野 護: Cardiac Na⁺ Channel Gene Mutations associated with Dilated Cardiomyopathy, 第78回日本循環器学会学術集会, 東京, 3.21-23, 2014 (Oral)
 - 15) 佐々木 健一: Modeling Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia using Human Induced Pluripotent Stem Cells: A Promising Tool for Drug Discovery, 第78回日本循環器学会学術集会, 東京, 3.21-23, 2014 (Poster)
 - 16) 山本雄大: Electrophysiological characteristics of human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes in a Long-Term culture, 第78回日本循環器学会学術集会, 東京, 3.21-23, 2014 (Poster)
 - 17) 牧山 武: Modeling Inherited Arrhythmias Using Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes and Application in Personalized Medicine, 第31回日本心電学会学術集会、第29回日本不整脈学会学術大会合同学術集会, 東京, 7.22-25, 2014 (シンポジウム)
 - 18) 張田健志: A Novel ANK2 Mutation in a Patient with Familial Atrial Fibrillation Detected by Next-generation Sequencing, 第31回日本心電学会学術集会、第29回日本不整脈学会学術大会合同学術集会, 東京, 7.22-25, 2014 (poster)
 - 19) 早野 護: A novel SCN10A mutation identified in a patient with familial Brugada syndrome, 第31回日本心電学会学術集会、第29回日本不整脈学会学術大会合同学術集会, 東京, 7.22-25, 2014 (poster)
- 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
以上、特筆すべき事項なし

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患等実用化研究事業）

委託業務成果報告（業務報告）

遺伝性心血管疾患における集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究

研究分担者 斎藤 能彦 奈良県立医科大学 教授

（研究協力者 尾上 健児 奈良県立医科大学 助教）

研究要旨

遺伝性心血管疾患は一つの臨床病型に数多くの候補遺伝子が含まれており、循環器難病の原因同定に際して症例間比較が困難であることが多く、循環器分野独特の解析戦略が必要である。かかる特性を加味しながら循環器遺伝難病のゲノム解析拠点形成のため、既知遺伝子の臨床診断応用、新規原因遺伝子同定に両者に重点を置き、大家系に対する遺伝子同定はもとより、少数症例解析に対応した情報解析システムを開発する。

全国循環器ゲノム解析ネットワークを構成するため、難治性疾患研究班、日本循環器各学会に属する研究各施設が分担となり、遺伝子情報の臨床現場への還元と診療ガイドラインへの反映するための臨床研究チームを構築する。とりわけ「臨床情報・迅速生体機能・相互作用分子探索」、原因同定に欠かせない3つの重要機能解析をゲノム解析と同時に実施できる研究基盤を整えた施設が協同し、創薬開発への発展性を高めた事業を展開する。

研究班で同定した新規原因遺伝子については創薬開発に資するシーズ探索を行うとともに、生体試料、臨床情報からしか入手できないアノテーションを情報解析に付加し汎用性の高い循環器ゲノムデータベースを作成する。最新のセキュアな情報管理システムの下に、一般研究班に迅速に情報を還元するシステム技術の開発を行う。

以上の業務を行う事で、難病遺伝子解析における標的シーズの同定と創薬開発に向けた取り組み、原因遺伝子同定による精密な疾患分類の実現、早期診断と治療最適化は、重症化予防医療の実現を目指す。

A. 研究目的

可避である。

ゲノム解析を要する循環器難病患者は数～十万人と非常に多く、原因遺伝子と臨床病型が1対1ではない拡張型心筋症は50種を超える遺伝子が同定されるも、未だ7割以上が原因遺伝子未同定である。精細な病因分類ができず治療の選択肢は乏しく、病態重症化と高度医療が不

難病克服のため全国規模の循環器ゲノム解析ネットワークの上に、ゲノム医学に精通する臨床研究医が戦略的に解析を実施し疾患 rare variant の同定を行い、臨床現場に遺伝子情報を還元する必要がある。

少子・核家族化のため家系内の全エクソン解析による遺伝子同定は完結しないため、①ゲノム解析、②臨床病態診断、③未知遺伝子機能解析の3者に精通した臨床研究医が、ゲノム解析に適した臨床レジストリ、循環器専門基礎解析、生化学的探索を協同実施できる総合力のある循環器ゲノム解析拠点が必要である。

B. 研究方法

1. ゲノム解析の基礎研究と臨床実用化

1) 遺伝性心血管疾患の原因同定の為の、既知・未知遺伝子解析のための環境整備とゲノム解析の実施

各遺伝子解析研究機関におけるゲノム解析を実施するためのオーダーシステムの構築と、その運用を目指す。さらにオーダーのみならず、同遺伝子解析研究システムを用いて、セキュアな環境で解析情報をフィードバックすることができる情報参照サーバーシステムの将来的構築も目指す。解析結果の報告フォーマットの作成と、臨床現場への遺伝子情報の還元するシステムの全国普及を目指す。

遺伝子解析に適合する症例のリスト化と臨床情報と遺伝子変異情報を蓄積し、原因検索の為の遺伝子解析へとつなげる環境を整備する。将来的には病態経過、薬効評価とも連結させ診療最適化に有用な付加価値あるゲノム情報を提供する。

2) 遺伝子機能解析による原因同定とその応用

疾患原因となる変異検索のため、既知遺伝子解析または既知遺伝子変異を除外した症例を中心に、全エクソーム解析を実施し、新規遺伝子変異の同定を試みる。候補化される未知遺伝子

変異に対して分子機能解析を実施し、責任遺伝子変異としての検証を行う。

ゲノム配列・情報解析から得られた情報をもとに、細胞機能、蛋白相互作用、生体機能、分子イメージングに至る一連の機能解析を実施し着目した遺伝子の分子機能を解析する。

2. 倫理的遵守事項

患者情報の解析に関しては施設の倫理委員会の承認を得た上、臨床研究倫理指針を遵守し慎重におこなう。その上で患者とは個別に、医師が書面に示した計画書を明示し、十分説明をしたうえで承諾を得たもののみを本研究に使用する。特に以下の点に留意する。

1) 試料提供者の個人識別情報を含む情報の保護：診療情報を含めた個人情報と検体とは徹底した匿名化を行い、遺伝情報と個人情報の連結は個人識別情報管理者のみが可能となるように個人識別情報管理者において情報を管理する。

2) 試料提供者に対する予想される危険や不利益およびそれらが生じた場合の措置：心筋生検試料採取は通常の診療の際に医学的必要に応じて行われたもののうち、診療に用いない残余検体を利用することとし、危険や不利益はないと考える。誤って遺伝情報が外部に漏洩した場合、就職・結婚・保険への加入等に関して不利益をこうむる可能性が考えられるため、これを防ぐために、個人識別情報管理者を置き、同管理者は試料の匿名化を行うとともに個人情報厳重に管理・保管し、試料提供者のプライバシーを保護する。

3) 試料提供者から採取した生体材料の取り扱いについて：提供された試料は、個人識別情報管理者が連結匿名化し、匿名化ラベルのみ貼っ