

側からの冠動脈が発達し、心内膜面からの血液供給に変わって冠血流が主体になっていく。在胎週数とともに緻密層の肥厚が進み、らせん状に配列した心筋の3層構造が完成されていく。

心筋緻密化障害は、胎生初期の心室壁の発達の過程において、スポンジ状の胎児心筋が遺残し、心筋緻密層が低形成になると考えられている (Sedmera D, et al. Anat Rec, 2000)。そして、著明な肉柱形成のために心内膜面や肉柱間隙からの血液供給が障害され、心内膜下の心筋虚血を引き起こし、心機能低下が起こると仮説されている。しかし、現在までこの仮説は実証されていない。

B. 研究方法

臨床面と基礎研究面の両面から心筋緻密化障害の発症機構を解明するために、まず、心筋緻密化障害の臨床像を検討する。次に、心筋緻密化障害患者において、胎生期における心筋層の発達・成熟に関わる遺伝子異常の探索を行う。さらに、探索された遺伝子異常が心筋の発達・成熟に及ぼす影響を明らかにするために、患者 iPS 細胞由来心筋細胞を作製し、機能解析を行う。具体的には、以下の4項目を行った。

- (i) 患者の臨床像の検討
- (ii) 患者血液サンプルの採取および遺伝子解析
- (iii) 患者血液サンプルからの iPS 細胞の樹立および iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導
- (iv) 患者 iPS 細胞由来心筋細胞の分化能および増殖能の評価、電気生理学的機能測定

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (文部科学省・厚生労働省・経済産業省) および臨床研究に関する倫理指針 (文部科学省・厚生労働省) を遵守して行う。すでに、本研究は、富山大学の遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会での承認を受けている (受付番号: 遺伝子 24-2)。また、富山大学遺伝子組換

え実験安全委員会より、組換え DNA 実験の承認をすでに得ている (受付番号: G2012UH-2)。遺伝子解析を施行するにあたっては、患者及び家族の人権と利益の保護の取り扱いに関して、十分に配慮して行う。遺伝子解析に関する十分な説明の後、インフォームドコンセントを得てから血液検体の採取を行い、遺伝子解析を開始する。必要に応じて、遺伝カウンセリングを実施する。

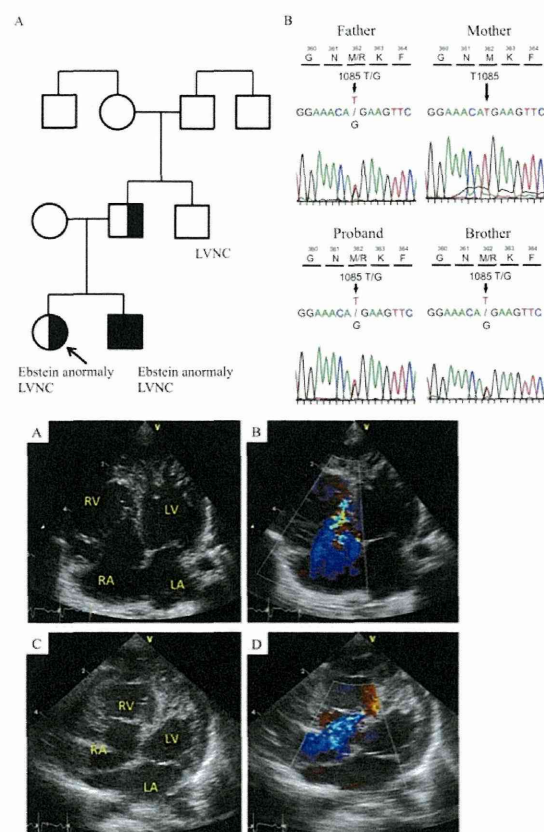
C. 研究結果

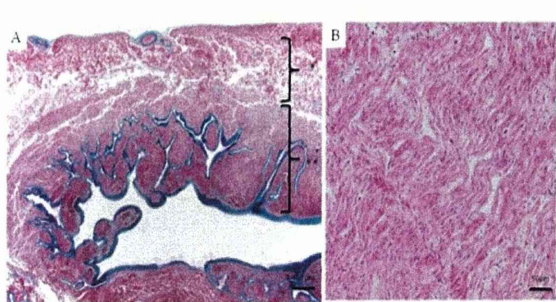
(i) 全国調査と臨床像の検討

小児期発症の心筋症の症例に対し、臨床像と遺伝的背景の有無を把握する。特に、家族性の有無、他の心筋症の有無、致死的不整脈や突然死の有無について検討を行った。

(ii) 患者血液サンプルの採取および遺伝子解析

血液検体から DNA を抽出し次世代シーケンサーにて遺伝子異常の有無を検討した。その結果、2家系からサルコメアの2遺伝子異常が明らかとなった (図参照)。





(iii) 患者血液サンプルから iPS 細胞の樹立
採取したサンプルから、レンチウイルスベクターにより細胞のリプログラミングに必要な因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) を遺伝子導入し、iPS 細胞を作成した (Warlich, et al. Molecular Therapy, 2011)。得られた iPS 細胞については機能解析にて未分化性を確認の上、心筋細胞への分化に利用する。まず、全ての株から DNA を抽出しシーケンスを行い、患者に由来する iPS 細胞に探索された遺伝子の変異が改変されていないことを確認した。さらに免疫蛍光染色法、リアルタイム PCR 等により、樹立した全ての iPS 細胞が万能性を示すことを確認した。

iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導
iPS 細胞を、Bone Morphogenetic Protein (BMP) およびその内因性阻害因子である Activin A、basic Fibroblast growth factor、Wnt 賦活剤および阻害剤を用いて、心筋細胞へと分化誘導を行った (Uosaki, et al. Plos one, 2011)。

D. 考察

今後の課題：患者 iPS 細胞由来心筋細胞の機能評価

(i) iPS 細胞由来心筋細胞の分化能評価

野生株と患者由来株の間で分化能および形態的な表現において差異を生じるか、遺伝子発現レベルおよび蛋白の発現レベルを評価する。遺伝子発現レベルは real-time RT-PCR にて野生株と患者由来株 iPS 細胞由来心筋細胞の TnnT や NKX2.5 などの心筋特異的 mRNA の発現を比較検討する。蛋白の発現レベルは免疫蛍光染色およびウェスタンブロット法にて野生株と患者由来株 iPS 細胞由来心筋細胞の TnnT や NKX2.5

などの心筋特異的蛋白の発現を比較検討する。

(ii) iPS 細胞由来心筋細胞の増殖能およびアポトーシスの評価

野生株と患者由来株の間で増殖能およびアポトーシスに差異を生じるか、Flow cytometry 法と免疫組織染色を行い評価する。増殖能に関しては、iPS 細胞由来心筋細胞を BrdU にて数時間培養し、BrdU を取り込ませた上で、細胞を回収し、抗 BrdU 抗体を用いて、BrdU 陽性細胞と非 BrdU 陽性細胞の比率を算出し、野生株と患者由来株間で比較検討する。アポトーシスに関しては、TUNEL 法を用いて、免疫染色を行い、野生株と患者由来株間で差異がないか比較検討する。
(iii) iPS 細胞由来心筋細胞の電気生理学的機能測定

パッチクランプ増幅器と倒立顕微鏡を用いて iPS 細胞由来心筋細胞からパッチクランプ法記録を行い、野生株と患者由来株の電気生理学的性質を比較し、不整脈性の有無を検討する。具体的には静電容量、ナトリウムおよびカリウム等イオンチャネルの電流密度、活性化/不活性化/脱活性化/脱不活性化速度を検査する。また、今回申請する 64ch 細胞外電位記録システムを用いて活動電位の発火頻度および持続時間を検査する。さらに、iPS 細胞由来心筋細胞に蛍光カルシウム・イメージング法を適用し、心筋の収縮能に必要な細胞内カルシウムの動態を野生株と患者由来株で比較する。

E. 結論

心筋緻密化障害は、心室壁の過剰な網目状の肉柱形成と深い間隙を特徴とした心筋症で、難治性心不全や突然死の原因となる疾患である。近年、年長児や成人の報告例も増えており、全国で1年間に約40例の小児期発症例が報告されていることから、稀な疾患ではないことが明らかになってきた。しかしながら、国内外を通じて心筋緻密化障害において系統的な臨床遺伝学的研究はなされておらず、網羅的な遺伝子異常スクリーニングの報告はない。

本研究では、NGSにより遺伝子異常が判明した患者の血液細胞から樹立したiPS細胞から心筋細胞を誘導し、さらにiPS細胞由来心筋細胞において関連遺伝子の機能解析を行う計画を立て、網羅的遺伝子解析の施行とiPS細胞由来心筋細胞の樹立ができた。この全く新しい研究パラダイム樹立できたことで、従来研究上の障壁であった機能解析が生体標本にて容易に行えるようになり、今後、心筋緻密化障害関与遺伝子の網羅的解析がはじめて可能になると考えられた。

本研究で遂行しきれなかった課題としてiPS細胞由来心筋細胞の分化能評価iPS細胞由来心筋細胞の増殖能およびアポトーシスの評価iPS細胞由来心筋細胞の電気生理学的機能測定が挙げられるが、本研究の継続により近々達成される予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hirono K, Hata Y, Ibuki K, Yoshimura N. Familial Ebstein Anomaly, Left Ventricular Noncompaction, and Ventricular Septal Defect Associated With a MYH7 Mutation. **J Thorac Cardiovasc Surg.** 2014;148:e223-6.
- 2) Nomura Y, Momoi N, Hirono K, Hata Y, Takasaki A, Nishida N, Ichida F. A Novel MYH7 Gene Mutation in a Fetus With Left Ventricular Noncompaction. **Can J Cardiol.** 2015; 31:103.e1-3.
- 3) Yoshida Y, Hirono K, Nakamura K, Suzuki T, Hata Y, Nishida N. A novel ACTC1 gene mutation in a young boy with left ventricular noncompaction and arrhythmias. **Heart Rhythm Case Report.** 2016;2(1):92-97.

2. 学会発表

- 1) Takasaki A, Ozawa S, Miyao N, Nakaoka H, Ibuki K, Hirono K, Yoshimura N, Ichida F. Clinical Features and Prognosis of Patients with Left Ventricular Noncompaction Cardiomyopathy: A Comparison between Infantile and Juvenile Types. The 88th

Scientific sessions of AHA 2015, Orlando, Florida, 2015.11

- 2) 小澤綾佳、仲岡英幸、伊吹圭二郎、廣野恵一、市田落子. 胎児期に右心不全にて気付かれた左室心筋緻密化障害の3例. 第21回日本胎児心臓病学会学術集会、平成27年2月13日、三重
- 3) Hirono K, Takasaki A, Hata Y, Nakaoka H, Ibuki K, Ozawa S, Sekine M, Yoshimura N, Nishida N, Ichida F. Sarcomere gene mutations in the patients with left ventricular noncompaction. 第79回日本循環器学会、平成27年4月25日、大阪
- 4) Hata Y, Kinoshita K, Ichida F, Hirono K, Mori H, Nishida N. Targeted Next-generation Sequencing for Postmortem Molecular Analysis of Sudden Cardiac Death. 第79回日本循環器学会学術集会、平成27年4月25日、大阪
- 5) 廣野恵一、畑由紀子、宮尾成明、高崎麻美、仲岡英幸、伊吹圭二郎、小澤綾佳、西田尚樹、市田落子. TAZ 遺伝子変異を伴う左室心筋緻密化障害における臨床遺伝学的検討. 第1回日本心筋症研究会、平成27年7月4日、東京
- 6) 高崎麻美、廣野恵一、畑由紀子、仲岡英幸、伊吹圭二郎、小澤綾佳、西田尚樹、芳村直樹、関根道和、市田落子. 若年性左室心筋緻密化障害におけるサルコメア遺伝子異常とその臨床的意義. 第1回日本心筋症研究会、平成27年7月4日、東京
- 7) 廣野恵一、畑由紀子、宮尾成明、仲岡英幸、高崎麻美、伊吹圭二郎、小澤綾佳、西田尚樹、市田落子. 胎児期・新生児期発症の左室心筋緻密化障害における臨床遺伝学的検討. 第51回日本小児循環器学会総会・学術集会、平成27年7月16日、東京
- 8) 趙 麻未、鮎沢 衛、加藤雅崇、渡邊拓史、小森暁子、阿部百合子、神保詩乃、神山 浩、高橋昌里、廣野恵一、市田落子、畑由紀子、西田尚樹. 家族歴による早期遺伝子診断と介入を行ないえたBarth症候群の乳児例. 第51回日本小児循環器学会総会・学術集会、平成27年7月17日、東京
- 9) 廣野恵一、畑由紀子、桃井伸緒、鮎沢衛、阿部百合子、辻井信之、林環、坂口平馬、阿部忠朗、宮尾成明、高崎麻美、仲岡英幸、伊吹圭二郎、小澤

綾佳、西田尚樹、市田蒔子、TAZ 遺伝子変異を伴う左室心筋緻密化障害の臨床遺伝学的検討

- 10) 高崎麻美、小澤綾佳、宮尾成明、仲岡英幸、伊吹圭二郎、廣野恵一、市田蒔子、左室心筋緻密化障害の乳児発症例と若年発症例の臨床像の検討。第24回小児心筋疾患学会 学術集会、平成27年10月24日、大阪

3. 書籍

- 1) 廣野恵一、市田蒔子：『肥大型心筋症類縁疾患』呼吸と循環 医学書院 東京、2015: 63 巻7号
- 2) 廣野恵一、市田蒔子：『診断モダリティとしての心筋病理：心筋緻密化障害』和泉徹・廣江道昭編 南江堂 東京、2015
- 3) 廣野恵一、市田蒔子：『左室心筋緻密化障害をどのように診断するか』Heart View「遺伝性心筋疾患の現状と展望を識る」メジカルビュー 東京、2016
- 4) 廣野恵一、市田蒔子：「心筋疾患」ガイドラインと最新文献で学ぶ 小児科学レビュー 総合医学者 東京、2016
- 5) 廣野恵一、市田蒔子：『心筋症』小児科臨床「小児慢性疾患の成人期移行の現状と問題点」日本小児医事出版社 東京 第69巻第4号
- 6) 廣野恵一、市田蒔子：「孤立性左室緻密化障害」『最新ガイドライン準拠 小児科診断・治療指針』中山書店 東京 2016

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

小児期心筋症の遺伝学的検査に関する研究 催不整脈性右室心筋症のコピー数多型

分担研究者 大野 聖子
所 属 滋賀医科大学 アジア疫学研究センター

研究要旨

【背景】催不整脈性右室心筋症（Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy, ARVC）の主要な原因は心筋細胞の結合に関与するデスモゾーム関連タンパクをコードする遺伝子の変異である。しかし、デスモゾームの変異同定率は 60%程度に留まっている。一方、通常の遺伝子解析法では検出困難なコピー数多型（CNV）が遺伝性不整脈疾患の原因として報告されている。【対象と方法】ARVC と診断された 71 人に対し、CNV を含めたデスモゾーム関連遺伝子の変異解析を行った。【結果】71 人中 33 人にデスモゾーム関連遺伝子変異を同定した。そのうち 1 名はデスモゾーム関連遺伝子の中でも頻度の高い、PKP2 の欠失であり、欠失範囲は隣接した二つの遺伝子にまで及んでいた。もともと PKP2 変異は missense 変異よりも停止コドンを生じる nonsense 変異や frameshift 変異の頻度が高い。そのため、今回 PKP2 欠失が同定された患者も、これまで PKP2 変異が同定された患者と同等の臨床症状を呈していた。【結論】ARVC 患者において、原因と考えられる遺伝子変異が同定されない場合には、CNV のスクリーニングが重要である。

A. 研究目的

ARVC は不整脈と右室拡大・変性、若年者の突然死を特徴とする遺伝性疾患である。その主要な原因は、細胞間接着に重要なデスモゾームタンパクをコードする遺伝子（PKP2, DSG2, DSC2, DSP）変異であるが、遺伝子変異同定率は ARVC 患者の約 60%に留まっている。一方、コピー数多型（CNV）はゲノム DNA のエクソン単位から遺伝子単位にわたる重複または欠失であるが、様々な遺伝性疾患との関与が報告されている。ただ、PCR をベースとした通常の遺伝子解析法では CNV の検出は困難である。そこで CNV を検出するための MLPA 法を用い、CNV によって生じる ARVC を同定し、その臨床的特徴を明らかにすることを目指す。

B. 研究方法

対象は、2010 年に発表された ARVC の診断基準を満たし、遺伝子解析に同意した 71 例。遺伝子変異解析は Sanger 法、次世代シーケンサー（NGS）を用いた対象遺伝子解析法を用いた。また CNV の検出には MLPA 法を用いた。欠失範囲の同定には定量 PCR（qPCR）法を用いた。

C. 研究結果

71 人中 32 人にデスモゾーム関連遺伝子変異を同定した。単独変異キャリアは 30 人であり、PKP2 変異 12 人、DSG2 変異 12 人、DSC2 変異 2 人、DSP 変異 4 人であった。残る 2 人は double mutation carrier であった。MLPA 法で CNV を調べたところ、これまで変異が同定されていなかった 1 人に PKP2 の欠失を同定した。（図 1）

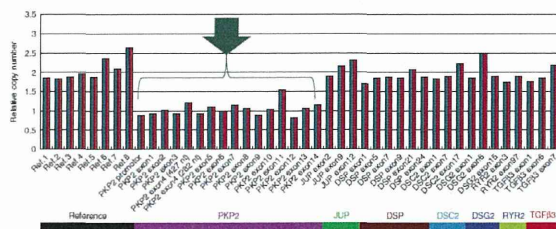


図1 MLPAの結果 PKP2の全エクソンの欠失を認める。

このPKP2欠失を同定した患者は31才男性で、運動後に強い動機と胸部不快感があり受診した。25才時から動悸の自覚症状があった。心電図では単型性のVTが記録され(図2A)、安静時心電図では下壁と右側胸部誘導での陰性T波が記録された(図2B)。遅延電位陽性であり(図2C)画像診断では右室の著明な拡大と収縮能低下を認めた(図2D)。これらの検査所見から、ARVCと診断されていた。

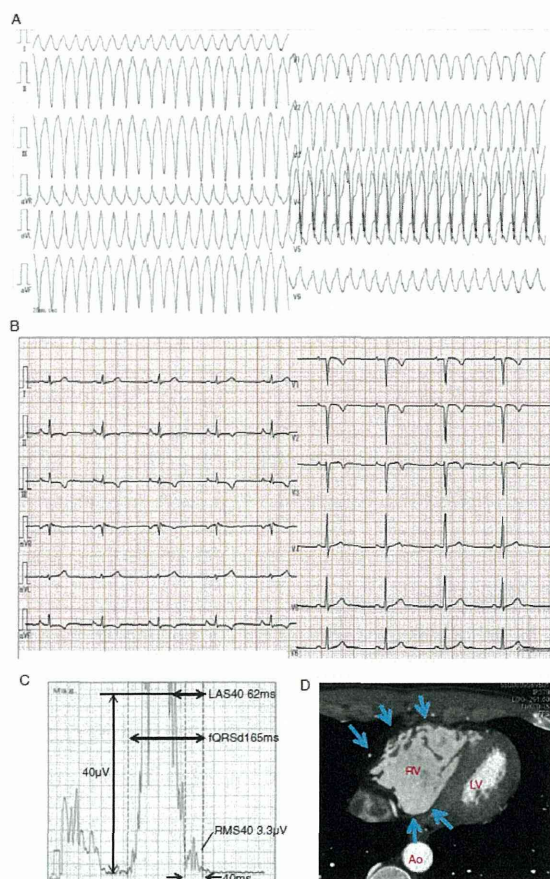


図2 患者検査データ

欠失範囲を同定するため、qPCRを同定したところ、その欠失範囲はPKP2下流にある二つの遺伝子に及んでいることが明らかになった。

(図3)

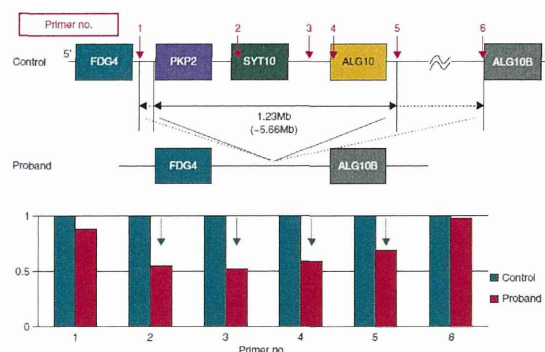


図3 遺伝子欠失範囲の同定

このPKP2欠失が同定された患者とPKP2のstop codonが生じる患者を比較したところ、その臨床像が非常に似ていることが明らかになった。

D. 考察

ARVCの主要な原因としてデスモゾーム関連遺伝子変異が報告されているが、その同定率は60%程度に留まっている。その理由の一つは、新規原因遺伝子の存在と考えられるが、NGSを用いた全エクソン解析が可能になった現在、新たな原因遺伝子の報告は多くないと思われる。PCRをベースとした解析では、NGSであっても特殊なデータ解析を実施しなければ、今回報告したCNVの同定は困難である。そのため、臨床像がこれまで報告されているデスモゾーム関連遺伝子変異キャリアと類似している場合には、CNVによる疾患発症を考慮する必要がある。

E. 結論

ARVCの原因として、デスモゾーム関連遺伝子のCNVが関与していることがあり、CNVの解析が重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sonoda K, Ohno S, Otsuki S, Kato K, Yagihara N, Watanabe H, Makiyama T, Minamino T, Horie M. Quantitative Analysis of PKP2 and Neighboring Genes in a Patient with Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Caused by Heterozygous PKP2 Deletion. **Euorpace**. 2016 Mar 22. pii: euw038. [Epub ahead of print]
- 2) Ozawa J, Ohno S, Hisamatsu T, Itoh H, Makiyama T, Suzuki H, Saitoh A, Horie M. Pediatric Cohort With Long QT Syndrome- KCNH2 Mutation Carriers Present Late Onset But Severe Symptoms. **Circ J**. 2016;80(3):696-702.
- 3) Ohno S. The genetic background of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. **J Arrhythmia**. 2016 Feb 24. [Epub ahead of print]
- 4) Itoh H, Crotti L, Aiba T, Spazzolini C, Denjoy I, Fressart V, Hayashi K, Nakajima T, Ohno S, Makiyama T, Wu J, Hasegawa K, Mastantuono E, Dagradi F, Pedrazzini M, Yamagishi M, Berthet M, Murakami Y, Shimizu W, Guicheney P, Schwartz PJ and Horie M. The genetics underlying acquired long QT syndrome: impact for genetic screening. **Eur Heart J**. 2015 Dec 28. pii: ehv695. [Epub ahead of print]
- 5) Honda T, Kanai Y, Ohno S, Ando H, Honda M, Niwano S and Ishii M. Fetal arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with double mutations in TMEM43. **Pediatr Int**. 2016 Feb 3. doi: 10.1111/ped.12832. [Epub ahead of print]
- 6) Chen J, Makiyama T, Wuriyanghai Y, Ohno S, Sasaki K, Hayano M, Harita T, Nishiuchi S, Yuta Y, Ueyama T, Shimizu A, Horie M and Kimura T. Cardiac sodium channel mutation associated with epinephrine-induced QT prolongation and sinus node dysfunction. **Heart Rhythm**. 2016;13(1):289-98.
- 7) Ohno S, Hasegawa K and Horie M. Gender Differences in the Inheritance Mode of RYR2 Mutations in Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia Patients. **PLoS ONE**. 2015;10(6):e0131517.

8) Kato K, Takahashi N, Fujii Y, Umehara A, Nishiuchi S, Makiyama T, Ohno S, Horie M. LMNA cardiomyopathy detected in Japanese arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy cohort. **J Cardiol**. 2015 Nov 24. pii: S0914-5087(15)00355-X. [Epub ahead of print]

9) Fukuyama M, Ohno S, Makiyama T, Horie M. Novel SCN10A variants associated with Brugada syndrome. **Europace**. 2015 Apr 4. pii: euv078. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

- 1) Ohno S, Aizawa Y, Fukuyama M, Makiyama T, Kosaki K, Fukuda K, Horie M. Do desmosome gene mutations cause or modify the Brugada syndrome? (Heart Rhythm 2015, Boston, USA)
- 2) Sonoda K, Ohno S, Otsuki S, Yagihara N, Watanabe H, Horie M. Quantitative Analysis of PKP2 and Neighboring Genes in a Patient with Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Caused by Heterozygous PKP2 Deletion. (Heart Rhythm 2015, Boston, USA)
- 3) Kawata H, Ohno S, Sumitomo N, Funasako M, Kamakura T, Nakajima I, Sakaguchi H, Miyazaki A, Miyamoto K, Inoue YY, Okamura H, Noda T, Aiba T, Kusano KF, Kamakura S, Horie M, Shimizu M: Triggers of cardiac events in RYR2 positive CPVT patients before and after optimal medical treatment. Importance of exercise restriction and avoidance of emotional stress especially in younger patient. (Heart Rhythm 2015, Boston, USA)
- 4) Ichikawa M, Ohno S, Fujii Y, Ozawa J, Sonoda K, Fukuyama M, Kato K, Itoh H, Horie M. Arrhythmogenic ventricular cardiomyopathy with peculiar ventricular aneurysm and TMEM43 mutations. (EHRA EUROPACE – CARDIOSTIM 2015, Milan, Italy)
- 5) Fukuyama M, Ohno S, Ichikawa M, Makiyama T, Horie M. SCN10A polymorphisms are associated with the clinical severity of probands with sodium channelopathies. (EHRA EUROPACE –

- CARDIOSTIM 2015, Milan, Italy)
- 6) Sonoda K, Ohno S, Ichikawa M, Fujii Y, Wang Q, Kato K, Fukuyama M, Ito H, Hayashi H, Horie M. AKAP9 mutations identified in young patients with idiopathic ventricular fibrillation or polymorphic ventricular tachycardia. (ESC CONGRESS 2015, London, England)
 - 7) Nishiuchi S, Makiyama T, Sasaki K, Khojitani Y, Ohno S, Yoshida Y, Doi T, Shizuta S, Horie M, Kimura T. Abnormal expression of cardiac ion channels-associated genes in lamin A/C-related cardiomyopathy-specific induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. (ESC CONGRESS 2015, London, England)
 - 8) Chen J, Makiyama T, Wuriyanghai Y, Ohno S, Ueyama T, Shimizu A, Horie M, Kimura T. Cardiac sodium channel mutation associated with epinephrine-induced QT prolongation and sinus node dysfunction. (ESC CONGRESS 2015, London, England)
 - 9) Ozawa J, Ohno S, Fujii Y, Makiyama T, Suzuki H, Saitoh A, Horie M. Differential Diagnosis of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia vs. Long QT Syndrome Type 1: A Modified Schwartz Scoring. (AHA Scientific Sessions 2015, Orlando, USA)
 - 10) Yamamoto Y, Makiyama T, Harita T, Sasaki K, Hayano M, Nishiuchi S, Wuriyanghai Y, Kohjitani H, Hirose S, Chen J, Ishikawa T, Ohno S, Yoshida Y, Horie M, Makita N, Kimura T. Modelling Long-QT Syndrome Associated With a Calmodulin Mutation Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. (AHA Scientific Sessions 2015, Orlando, USA)
 - 11) Ohno S. Case 4: Learning from Challenging Genetic Heart Disease Cases. (APHS2015, Melbourne, Australia)
 - 12) Ohno S. CPVT: Challenging inherited arrhythmia syndromes: the latest. (APHS2015, Melbourne, Australia)
 - 13) Ohno S. Brady and Atrial Arrhythmias in CPVT Patients with RYR2 Mutations (APHS2015, Melbourne, Australia)
 - 14) Ohno S, Horie M. Left ventricular non-compaction (APHS2015, Melbourne, Australia)
 - 15) Ohno S, Horie M. What is Needed for Cardiologists Who Engage Themselves in Childcare (第 79 回日本循環器学会総会・学術集会, 2015 シンポジウム)
 - 16) Fukuyama M, Ohno S, Wang Q, Shirayama T, Itoh H, Horie M: Nonsense-Mediated mRNA Decay due to a CACNA1C Splicing Mutation in a Patient with Brugada Syndrome (第 30 回日本不整脈学会学術大会, 2015 最優秀研究奨励賞受賞)
 - 17) Ohno S, Wada Y, Sonoda K, Horie M: Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy from the Genetic Basis to the Clinical Symptoms (第 30 回日本不整脈学会学術大会, 2015 シンポジウム)
 - 18) 大野聖子, 堀江稔. 「QT 延長症候群の遺伝子診断と臨床への活用」(第 63 回日本心臓病学会学術集会 2015 シンポジウム)
 - 19) 大野聖子, 堀江稔 「カテコラミン誘発性多型性心室頻拍患者に同定された RYR2 変異の遺伝に関する性差」 日本人類遺伝学会第 60 回大会 2015

G. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

進行性心臓伝導障害の新規疾患遺伝子に関する研究

分担研究者 蒔田 直昌¹⁾

研究協力者 石川 泰輔¹⁾

所 属 ¹⁾長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 分子生理学

研究要旨

【背景】進行性心臓伝導障害 (PCCD) の新規疾患遺伝子を解明すること。【対象と方法】既知の遺伝子変異が除外された日本人進行性心臓伝導障害 10 家系の網羅的遺伝子解析を行った。【結果】5 世代の PCCD 日本人大家系（罹患者 17 人、非罹患者 9 人）で、表現型と遺伝型が完全に一致するタイチン (*TTN*) のスプライシング変異を見出した。その他の PCCD 9 家系のうち 1 家系に *TTN* のナンセンス変異を同定した。【結論】巨大サルコメア遺伝子 *TTN* は拡張型心筋症のみならず、PCCD の原因遺伝子であることが判明した。

A. 研究目的

進行性心臓伝導障害 (Progressive Cardiac Conduction Defect; PCCD) は器質的心疾患を伴わない 50 歳未満の若年に見られる原因不明の進行性の心臓伝導障害である。これまで心筋チャネル遺伝子 (*SCN5A*, *SCN1B*, *TRPM4*, *GJA5*) や核膜タンパク (*LMNA*) の変異が報告されているが、原因遺伝子が未解明の症例も少なくない。本研究では、PCCD の日本人 1 大家系（突然死 2 例、ペースメーカー植え込み 5 名、完全右脚ブロック 15 名）に着目し、網羅的遺伝子解析手法で原因遺伝子を解明した。

B. 研究方法

1. PCCD 家系

PCCD は、Mobitz II 型 2 度以上の房室ブロックまたは脚ブロックで、発症時・登録時に器質的心疾患の合併がなく、50 歳未満の症例と定義した。本研究では、*SCN5A*, *SCN1B*, *TRPM4*, *GJA5*, *LMNA* に変異がないことをあらかじめ確認した日本人 PCCD 10 家系を対象とした。そのうち家系 A は、罹患者 17 人、非罹患者 9 人を有する 5

世代の大家系である。

2. ゲノムワイド SNP 解析・アレイ CGH

家系 A の生存罹患者 10 人で、Axiom Genome-Wide Human Array Plate (56 万個の SNP と Indel) でゲノムワイド SNP タイピングをし、アレイ CGH でゲノム上の欠損・重複を確認した。

3. 全エクソン解析・サンガーシークエンス

罹患者 3 人・非罹患者 1 人の全エクソンを Sure Select All Exon Capture Kit v4 (Agilent) でキャプチャーし、HiSeq2000 (Illumina) でシークエンスを解析した。BWA でヒトゲノムレファレンス hg19 にマッピングし、GATK と SAMTool でバリエーションをコールした。1000Genome・日本人 100 人エクソームデータベース (HGVD) ・ ExAC のデータベース上のバリエーション (MAF<1%) を KINME-Bio を用いてフィルタリングした。候補バリエーションは PCR direct sequence 法と 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で確認した。

4. Mini gene

患者ゲノムの *TTN* の exon 260~263 をまたぐゲノム領域 2.0 kb を PCR で増幅し、mini gene 用プラスミド pSPL3 にクローニングした。COS-7 細胞にトランスフェクション後 RNA を回収し、RT-PCR でトランスクリプトのシーケンスを確認した。

5. iPS 心筋細胞

患者末梢血から iPS を樹立した。現在心筋細胞に誘導中である。

6. ゲノム再キャプチャー

上記の全エクソン解析の結果を確認するために、罹患者 4 人のゲノムで、第 2 染色体 25 Mb (172,996,789_197,667,205) ゲノム領域をキャプチャーする SeqCap (Roche) カスタムデザインし、HiSeq2000 でシーケンスした。フィルタリングは、エクソームデータベース 1000G・HGVD で MAF<1%と、全ゲノムデータ（東北メガバンク日本人 SNP, MAF<5%と長崎大学 8 人新規）を用いた。4 人に共通するゲノムバリエーション 1887 個を、さらに、理研・バイオバンクジャパン日本人非循環器患者 1000 人の全ゲノムデータベース (BBJ-WGS_1K) の頻度データを用いてフィルタリングし、転写・翻訳に影響を与える可能性のあるものを同定した。

7. ターゲットエクソン解析

TTN が PCCD の新規疾患遺伝子であることを確認するために、不整脈・心疾患関連遺伝子 459 個を搭載したカスタム SeqCap エクソンキャプチャープローブを作成し、HiSeq2500 (Illumina) で家系 A を除く 9 家系のターゲットエクソン解析を行った。

（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（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

ゲノムワイド SNP タイピングで、家系 A の疾患関連領域は染色体 2q の 25Mb 領域に特定できた。アレイ CGH では遺伝子の重複・欠損は見られなかった。罹患者 3 人・非罹患者 1 人の全エクソン解析では、第 2 染色体に存在し、4 人の表現型に一致するレアバリエーション (MAF<1%) が 2 つ同定された。そのうち一つは V 型コラーゲン遺伝子 *COL5A2* の変異 L80V だった。これは海外の多型データベースには存在しないが、日本人では健常人の 0.9%に存在するため、疾患変異ではなく本家系に特異的なタグ SNP の可能性が高いと考えられた。もう一つのバリエーションは、巨大サルコメア遺伝子 *TTN* のエクソン 262 上流の新規スプライシング変異だった。この *TTN* 変異は罹患者家族 11 人・非罹患者家族 5 人で遺伝型・表現型が完全に一致していた。*TTN* のエクソン 260-263 の mini gene 実験から、停止コドンをもたらす 2 種類の短縮型変異トランスクリプトが確認された。現在、罹患者一人から樹立した iPS 細胞を心筋細胞に誘導しており、これを用いて患者心筋における転写異常を確認する予定である。さらに罹患者 4 人に共通する染色体 2q の 25Mb 上のゲノムバリエーション 1887 個を、BBJ-WGS_1K (MAF<1%) でフィルタリングしたところ、185 個に狭まった。そのうち、転写・翻訳に影響を与える可能性のあるものは唯一、エクソームで明らかになったものと同じ、*TTN* のスプライシング変異だった。

TTN が PCCD の新規疾患遺伝子であることを確認するために、不整脈・心疾患関連遺伝子 459 個のターゲットエクソン解析で、変異陰性の PCCD 9 家系を解析したところ、1 家系に *TTN* の (エクソン 48) にナンセンス変異を同定した。この変異は *TTN* の I バンド領域に存在し、家系 A と同様に短縮型の変異タンパクをもたらす変異であることが判明した。この変異もどのデータベースにも登録がない。今後家系解析を行う予定である。

D. 考察

本研究では網羅的遺伝子解析によって、PCCD 2 家系にデータベース未登録の *TTN* の短縮型変異が同定された。そのうち家系 A に見られた変異は、家族 16 人で表現型・遺伝型が完璧に一致していた。以上から *TTN* は PCCD の新たな疾患遺伝子であると推測される。

TTN は巨大遺伝子であり、疾患に関連のない *private variation* が数多く存在することが知られている。しかし、短縮型変異、なかでも A バンド領域に存在する短縮型変異は、拡張型心筋症の原因遺伝子であることが証明されており、ミスセンス変異とは生物学的意味合いが異なる。

本研究で明らかにされた *TTN* の変異がどのようなメカニズムで伝導障害をきたすかに関しては、現時点では不明である。しかし *TTN* はサルコメアの Z バンドと M バンドを結ぶ巨大タンパクタイチンをコードするだけでなく、心臓の伝導に関連する様々な遺伝子産物 (*MYHC*, *NEB*, *DES*, *KCNE1*) と直接的・間接的に連関していることが知られており、これらの機能分子の連関異常が心臓伝導障害の基盤になっている可能性が考えられる。

E. 結論

タイチン (*TTN*) は拡張型心筋症のみならず、PCCD の原因遺伝子でもあると考えられる。363 個のエクソンをもつ巨大遺伝子 *TTN* をサングー法でスクリーニングするのは現実的ではないので、今後 PCCD の遺伝子解析の効率化を図るために、*TTN* を載せた疾患スクリーニングパネルの作成と網羅的遺伝子解析の実施を検討する必要があると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

[国際]

- 1) Daumy X, Amarouch MY, Lindenbaum P, Bonnaud S, Charpentier E, Bianchi B, Nafziger S, Baron E, Fouchard S, Thollet A, Kyndt F, Barc J, Le Scouarnec

S, Makita N, Le Marec H, Dina C, Gourraud JB, Probst V, Abriel H, Redon R, Schott JJ. Targeted resequencing identifies TRPM4 as a major gene predisposing to progressive familial heart block type I. **Int J Cardiol** 207:349-358, 2016.

- 2) Harrell DT, Ashihara T, Ishikawa T, Tominaga I, Mazzanti A, Takahashi K, Oginosawa Y, Abe H, Maemura K, Sumitomo N, Uno K, Takano M, Priori SG, Makita N. Genotype-dependent differences in age of manifestation and arrhythmia complications in short QT syndrome. **Int J Cardiol** 190:393-402, 2015.
- 3) Hayashi K, Konno T, Tada H, Tani S, Liu L, Fujino N, Nohara A, Hodatsu A, Tsuda T, Tanaka Y, Kawashiri MA, Ino H, Makita N, Yamagishi M. Functional Characterization of Rare Variants Implicated in Susceptibility to Lone Atrial Fibrillation. **Circ Arrhythm Electrophysiol** 8(5):1095-1104, 2015.
- 4) Ishikawa T, Jou CJ, Nogami A, Kowase S, Arrington CB, Barnett SM, Harrell DT, Arimura T, Tsuji Y, Kimura A, Makita N. Novel mutation in the alpha-myosin heavy chain gene is associated with sick sinus syndrome. **Circ Arrhythm Electrophysiol** 8(2):400-408, 2015.
- 5) Ishikawa T, Tsuji Y, Makita N. Inherited bradyarrhythmia: A diverse genetic background. **J Arrhythm** In press 2015.
- 6) Maharni N, Ting YK, Cheng J, Hasegawa A, Kurata Y, Li P, Nakayama Y, Ninomiya H, Ikeda N, Morikawa K, Yamamoto K, Makita N, Yamashita T, Shirayoshi Y, Hisatome I. Molecular Mechanisms Underlying Urate-Induced Enhancement of Kv1.5 Channel Expression in HL-1 Atrial Myocytes. **Circ J** 79(12):2659-2668, 2015.
- 7) Nademanee K, Raju H, de Noronha SV, Papadakis M, Robinson L, Rothery S, Makita N, Kowase S, Boonmee N, Vitayakritsirikul V, Ratanarapee S, Sharma S, van der Wal AC, Christiansen M, Tan HL, Wilde AA, Nogami A, Sheppard MN, Veerakul G, Behr ER. Fibrosis, connexin-43, and conduction abnormalities in the Brugada syndrome. **J Am Coll Cardiol** 66(18):1976-1986, 2015.

2. 学会発表

[国際学会]

- 1) Makita N. SCN5A and ventricular arrhythmias. Asian Pacific Heart Rhythm Society, 2015/11/22, Melbourne, Australia.
- 2) Makita N. New genes for Progressive Cardiac Conduction Disease. Heart Rhythm Society, 2015/05/14, Boston, USA.
- 3) Ishikawa T, Ohkubo K, Yamaguchi R, Harrell DT, Tsuji Y, Watanabe I, Makita N. Dose-Sensitive Relationship of an SCN10A Pore Mutation and Enhancer SNPs Identified in a Brugada Syndrome Family with Different Expressivity. Heart Rhythm Society, 2015/05/15, Boston, USA.

G. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

備考

本研究は本厚労科研による他施設国内共同研究と、JSPS 二国間共同研究のサポートによるフランス INSERM の遺伝性不整脈研究チームとの国際共同研究によって行われた。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<u>廣野恵一</u> <u>市田蒔子</u>	左室心筋緻密化障害をどのように診断するか	磯部光章 前嶋康浩	Heart View「遺伝性心筋疾患の現状と展望を識る」	メジカルビュー	東京	2016	27-37
<u>廣野恵一</u> <u>市田蒔子</u>	心筋疾患		ガイドラインと最新文献で学ぶ 小児科学レビュー	総合医学者	東京	2016	
<u>廣野恵一</u> <u>市田蒔子</u>	心筋症	藤井良知 加藤精彦 早川浩	小児科臨床「小児慢性疾患の成人期移行の現状と問題点」	日本小児医事出版社	東京	2016	第 69 巻 第 4 号
<u>廣野恵一</u> <u>市田蒔子</u>	孤立性左室緻密化障害		「最新ガイドライン準拠 小児科診断・治療指針」	中山書店	東京	2016	
<u>廣野恵一</u> <u>市田蒔子</u>	肥大型心筋症類縁疾患	和泉徹	呼吸と循環	医学書院	東京	2015	63 巻 7 号
<u>廣野恵一</u> <u>市田蒔子</u>	心筋緻密化障害	和泉徹 廣江道昭	診断モダリティとしての心筋病理	南江堂	東京	2015	
石川泰輔 <u>蒔田直昌</u>	Brugada 症候群の遺伝子診断～有効性と限界～	池田隆徳 清水渉 高橋尚彦	不整脈症候群－遺伝子変異から不整脈治療を捉える－	南江堂	東京	2015	82-85
<u>蒔田直昌</u>	早期再分極（J波）症候群の遺伝子解析～危険な J 波は見極められるか？～	池田隆徳 清水渉 高橋尚彦	不整脈症候群－遺伝子変異から不整脈治療を捉える－	南江堂	東京	2015	116-120
<u>蒔田直昌</u>	遺伝子解析が有効な不整脈疾患は？	平尾見三 笹野哲郎	不整脈診療クリニックエッセション	診断と治療社	東京	2015	162-163
<u>蒔田直昌</u>	Progressive cardiac conduction disturbance (PCCD)とは？	平尾見三 笹野哲郎	不整脈診療クリニックエッセション	診断と治療社	東京	2015	164-165

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<u>蒔田直昌</u>	QT短縮症候群とは？	平尾見三 笹野哲郎	不整脈診療クリニカルケースション	診断と治療社	東京	2015	166-167
<u>蒔田直昌</u>	不整脈のゲノムワイド解析はどこまで進んでいる？	平尾見三 笹野哲郎	不整脈診療クリニカルケースション	診断と治療社	東京	2015	167-168
<u>佐藤誠一</u>	小児心エコー法テクニカルガイド	佐藤誠一	小児心エコー法テクニカルガイド	診断と治療社	東京	2011	ii-113
衛藤隆 長嶋正實 <u>岩本真理</u> 村上睦美 他7名	児童生徒の健康診断における心臓検査に関する調査	衛藤隆	平成25年度学校生活における健康管理に関する調査事業報告	日本学校保健会	東京	2014	23-38
<u>泉田直己</u>	児童生徒などの健康診断	水口雅 市橋光 崎山弘	今日の小児治療指針第16版	医学書院	東京	2015	777-779

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Imamura T, Tanaka Y, Ninomiya Y, <u>Yoshinaga M.</u>	Combination of flecainide and propranolol for congenital junctional ectopic tachycardia.	Pediatr Int.	Aug;57(4)	716-8	2015
<u>Yoshinaga M.</u> , Kucho Y, Nishibatake M, <u>Ogata H.</u> , Nomura Y.	Probability of diagnosing long QT syndrome in children and adolescents according to the criteria of the HRS/EHRA/APHRS expert consensus statement.	Eur Heart J.		Epub ahead of print	2016
Sonoda K, <u>Ohno S.</u> , Otsuki S, Kato K, Yagihara N, Watanabe H, Makiyama T, Minamino T, <u>Horie M</u>	Quantitative Analysis of PKP2 and Neighboring Genes in a Patient with Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Caused by Heterozygous PKP2 Deletion.	Europace		Epub ahead of print	2016
<u>Ohno S</u>	The genetic background of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy	J Arrhythmia		Epub ahead of print	2016

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Honda T, Kanai Y, <u>Ohno S</u> , Ando H, Honda M, Niwano S, Ishii M.	Fetal arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with double mutations in TMEM43.	Pediatr Int.		Epub ahead of print	2016
Kato K, Takahashi N, Fujii Y, Umehara A, Nishiuchi S, Makiyama T, <u>Ohno S</u> , <u>Horie M</u> .	LMNA cardiomyopathy detected in Japanese arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy cohort. Journal of Cardiology	J Cardiol		Epub ahead of print	2015
Nomura Y, Momoi N, <u>Hirono K</u> , Hata Y, Takasaki A, Nishida N, <u>Ichida F</u> .	A Novel MYH7 Gene Mutation in a Fetus With Left Ventricular Noncompaction.	Can J Cardiol	31	E1-3	2015
Yoshida Y, <u>Hirono K</u> , Nakamura K, Suzuki T, Hata Y, Nishida N.	A novel ACTC1 gene mutation in a young boy with left ventricular noncompaction and arrhythmias.	Heart Rhythm Case Report	2(1)	92-97	2016
<u>Hirono K</u> , Hata Y, Ibuki K, Yoshimura N.	Familial Ebstein Anomaly, Left Ventricular Noncompaction, and Ventricular Septal Defect Associated With a MYH7 Mutation.	J Thorac Cardiovasc Surg	148	E223-6	2014
阿部百合子、鮎沢 衛、加藤雅崇、渡邊拓史、趙 麻美、小森暁子、大熊洋美、市川理恵、神山 浩、 <u>住友直方</u> 、伊東三吾、高橋昌里	学校管理下における肥大型心筋症による心事故発生状況の変化	Ped Cardiol Cardiac Surg	31	240-245	2015
Suzuki T, <u>Sumitomo N</u> , Yoshimoto J, Miyazaki A, Hinokiyama K, <u>Ushinohama H</u> , Yasukochi S	Current Trends in Use of Implantable Cardioverter Defibrillators and Cardiac Resynchronization Therapy With a Pacemaker or Defibrillator in Japanese Pediatric Patients	Circ J.	78(7)	1710 - 1716	2014
Mitani Y, <u>Ohta K</u> , <u>Ichida E</u> , Nii M, Arakaki Y, <u>Ushinohama H</u> , Takahashi T, Ohashi H, Yodoya N, Fujii E, Ishikura K, <u>Tateno S</u> , <u>Sato S</u> , Suzuki T, Higaki T, <u>Iwamoto M</u> , <u>Yoshinaga M</u> , <u>Nagashima M</u> , <u>Sumitomo N</u>	Circumstances and Outcomes of Out-Of-Hospital Cardiac Arrest in Elementary and Middle School Students in the Era of Public-Access Defibrillation: Implications for Emergency Preparedness in Schools	Circ J	78	701-7	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Daumy X, Amarouch MY, Lindenbaum P, Bonnaud S, Charpentier E, Bianchi B, Nafzger S, Baron E, Fouchard S, Thollet A, Kyndt F, Barc J, Le Scouarnec S, <u>Makita N</u> , Le Marec H, Dina C, Gourraud JB, Probst V, Abriel H, Redon R, Schott JJ.	Targeted resequencing identifies TRPM4 as a major gene predisposing to progressive familial heart block type I	Int J Cardiol	207	349-358	2016
Ishikawa T, Jou CJ, Nogami A, Kowase S, Arrington CB, Barnett SM, Harrell DT, Arimura T, Tsuji Y, Kimura A, <u>Makita N</u> .	Novel mutation in the alpha-myosin heavy chain gene is associated with sick sinus syndrome.	Circ Arrhythm Electrophysiol	8(2)	400-408	2015
Maharani N, Ting YK, Cheng J, Hasegawa A, Kurata Y, Li P, Nakayama Y, Ninomiya H, Ikeda N, Morikawa K, Yamamoto K, <u>Makita N</u> , Yamashita T, Shirayoshi Y, Hisatome I.	Molecular Mechanisms Underlying Urate-Induced Enhancement of Kv1.5 Channel Expression in HL-1 Atrial Myocytes.	Circ J	79(12)	2659-2668	2015
Nademanee K, Raju H, de Noronha SV, Papadakis M, Robinson L, Rothery S, <u>Makita N</u> , Kowase S, Boonmee N, Vitayakritsirikul V, Ratanarapee S, Sharma S, van der Wal AC, Christiansen M, Tan HL, Wilde AA, Nogami A, Sheppard MN, Veerakul G, Behr ER.	Fibrosis, connexin-43, and conduction abnormalities in the Brugada syndrome.	J Am Coll Cardiol	66(18)	1976-1986,	2015
Nakano U, <u>Iwamoto M</u> , Masuda M	Usefulness of Real-time three-dimensional trans-esophageal echocardiography for detection of isolated unroofed coronary sinus.	Cardiology in Young	19	1-3	2014
<u>泉田直己</u>	心臓検診	小児科	56	1313-1324	2015

