

201510099A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等政策研究事業
(難治性疾患政策研究事業)

遺伝子診断に基づく不整脈疾患群の病態解明
および診断基準・重症度分類・
ガイドライン作成に関する研究

平成27年度 総括研究報告書

研究代表者 堀江 稔
(滋賀医科大学)

平成28(2016)年3月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等政策研究事業
(難治性疾患政策研究事業)

遺伝子診断に基づく不整脈疾患群の病態解明
および診断基準・重症度分類・
ガイドライン作成に関する研究

平成27年度 総括研究報告書

研究代表者 堀江 稔
(滋賀医科大学)

平成28(2016)年3月

目 次

I. 総括研究報告

- 遺伝子診断に基づく不整脈疾患群の病態解明および診断基準・重症度分類・ガイドライン
作成に関する研究 堀江 稔…… 1

II. 分担研究報告

1. ブルガダ症候群と早期再分極症候群の類似点と
相違点に関する研究 清水 渉…… 7
2. 日本の大規模登録研究における Brugada 症候群のリスク層別化と
長期予後に関する研究 青沼 和隆……10
3. 遺伝子診断に基づく不整脈疾患群の病態解明および診断基準・
重症度分類・ガイドライン作成に関する研究 蒔田 直昌……15
4. 遺伝子診断に基づく不整脈疾患群の病態解明および診断基準・
重症度分類・ガイドライン作成に関する研究 住友 直方……19
5. 早期再分極症候群における不良な予後の予知指標に関する
研究に関する研究 鎌倉 史郎……27
6. 遺伝子診断に基づく不整脈疾患群の病態解明および診断基準・
重症度分類・ガイドライン作成に関する研究 萩原 誠久……30
7. 遺伝子診断された先天性 QT 延長症候群 7 型 (Andersen-Tawil 症候群) の
心電図解析～独立成分分析と主成分分析を用いた U 波の解析～
に関する研究 堀米 仁志、石川 康宏……33
8. 遺伝子診断に基づく不整脈疾患群の病態解明および診断基準・
重症度分類・ガイドライン作成に関する研究 福田 恵一、湯浅 慎介、相澤 義泰……39
9. HRS/EHRA/APHRs Expert Consensus Statement 基準に基づいた
小児期 QT 延長症候群の頻度に関する研究 吉永 正夫、九町 木綿、西島 信、緒方 裕光、野村 裕一……41

10. LMNA 関連心筋症における性差、変異部位の検討に関する研究	牧山 武	……46
11. 遺伝子診断に基づく不整脈疾患群の病態解明および 診断基準・重症度分類・ガイドライン作成に関する研究	渡部 裕	……50
12. 発熱を契機に QT 延長、Torsades de pointes を発症した Type2 QT 延長症候群の発症メカニズムに関する研究	林 研至	……51
13. 全エクソーム解析による先天性 QT 延長症候群患者の 新規候補遺伝子の同定に関する研究	相庭 武司	……55
14. 遺伝性不整脈の遺伝子検査に関する研究 宮本 恵宏、太田 直孝、藤山 啓美、増田 弘明		……58
15. 遺伝子診断に基づく不整脈疾患群の病態解明および診断基準・ 重症度分類・ガイドライン作成に関する研究	白石 公、宮崎 文	……60
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表		63
Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷		73

I . 総括研究報告

遺伝子診断に基づく不整脈疾患群の病態解明および診断基準・重症度分類・
ガイドライン作成に関する研究

研究代表者 堀江 稔 滋賀医科大学 教授

研究要旨

遺伝性不整脈は、心臓の興奮・伝導・収縮に関わる多様な蛋白群をコードする遺伝子レベルの異常により、その機能が傷害され、結果として不整脈を起こす疾患群である。とくに、その中でもブルガダ症候群における不整脈は、心房細動と心室細動が知られており、とくに後者は心臓突然死につながる重篤な病態である。今回は、われわれの研究班におけるブルガダ症候群のコホートに注目して、遺伝的異常から招来されるであろう機能障害と臨床像の検討を行った。

A. 研究目的

本研究ではこれまで蓄積された遺伝性不整脈データベースに基づいた病態・診断・治療法を解明し、遺伝性不整脈疾患の診断基準・重症度分類・診療ガイドラインの確立や普及を行い、医療水準の向上に貢献することを目的とする。申請者の堀江らは、H18年以来厚生労働科学研究費補助金による先天性 LQTS の登録研究（『致死性遺伝性不整脈疾患の遺伝子診断と臨床応用』（H18-ゲノム一般-002）、『先天性 QT 延長症候群の家族内調査による遺伝的多様性の検討と治療指針の決定』（H23-難治一般-088））により、先天性 LQTS 1350 例の遺伝情報と臨床情報を含む世界的にも最大規模のデータベースを有し、これまで国内外の多施設共同研究により遺伝子型あるいは遺伝子変異部位別のリスク階層化および特異的治療法について報告してきた。また清水は、ブルガダ症候群の登録研究（H18-ゲノム一般-002）で、500 例の遺伝情報を含むデータベースを有している。ブルガダ症候群の調査研究（H22-難治一般-144）から、日本人のブルガダ症候群は欧米人とは異なる予後を示すことを報告している（Kamakura

et al, Circulation A&EP 2009）。また、班員の多くはこれまで難治性疾患克服研究事業の主任研究者として PCCD、ERS、小児科領域の先天性 LQTS 患者の遺伝情報を含んだデータベースを蓄積し（H22-難治一般-145、H23-難治一般-114、H22-難治一般-053）、その成果を報告してきた（Horigome, Circulation A&EP, 2010）。このような実績から、堀江と清水は、米国、欧州、アジアの三大陸不整脈学会による遺伝性不整脈の診断基準・治療のガイドラインの作成メンバーとして、国際診断基準作成に携わっている（Horie M et al, Heart Rhythm, Europace, J Arrhythmia 2013）。本研究班は、これまでの登録研究データベースをオールジャパン体制で共有し、各種遺伝性不整脈疾患の診断基準・重症度分類・診療ガイドラインの確立や普及に寄与するものである。また、保険診療が承認されていない遺伝性不整脈疾患について保険診療化をめざす。

B. 研究方法

1. 遺伝子変異、多型の同定（平成27年度）

患者から遺伝子検索に関する十分な説明を

行い書面でインフォームド・コンセントを得た後に、約10mlの末梢血を採取し遠心分離にかけ、白血球から遺伝子を採取する。これらの遺伝子に対し目的とする部位の遺伝子増幅(PCR)をかけ、コントロールとともにスクリーニングにかける。スクリーニングには WAVE 解析装置(Transgenomic社)を利用した変性高速液体クロマトグラフィー(DHPLC法)を用いる。さらに異常バンドが認められた場合、遺伝子異常同定法(direct sequence法)を用いて、異常塩基の同定を行いアミノ酸の変化を確認する。家族の協力が得られる場合は家族の遺伝子変異の有無も検討し、臨床病態との関係を検討する。なお、検索に必要な機器は堀江、清水、宮本、蒔田、相庭、福田、吉永、牧山、渡部、林の施設にすでに設置済みである。本研究班は、H18年以來、厚生労働科学研究費補助金により先天性LQTS患者の登録研究を開始し、すでに1123例の遺伝情報と臨床情報を含む世界的にも最大規模のデータベースを有している(堀江、清水)。また、各分担研究者により、ブルガダ症候群約500例(清水)、PCCD74家系(蒔田)、CPVT患者79例(住友)、ERS患者54例(鎌倉、渡部)、小児科領域の先天性LQTS患者197例(吉永、堀米)のデータベースをすでに有している。H26~28年度にかけて、これらの遺伝性不整脈疾患で引き続き遺伝子診断を継続する。

2. 遺伝子基盤に基づいた遺伝性不整脈疾患の診断基準・重症度分類・診療ガイドラインの確立と普及 (平成27年度)

分担研究者の青沼は、日本循環器学会「QT延長症候群(先天性・二次性)とブルガダ症候群の診療に関するガイドライン改訂版」の作成班班長であり、また代表研究者の堀江や多くの分担研究者が同作成班の班員・研究協力者である。一方、堀江と清水が作成メンバーとして参加した米国、欧州、アジアの三大陸不整脈学会による遺

伝性不整脈の診断基準・治療のガイドライン(Consensus Statement)が最近発表された(Horie M, Shimizu W, et al, Heart Rhythm 2013, Europace 2013, J Arrhythmia 2013)。この国際診断基準との整合性を取りつつ、本研究において得られる日本人独自の遺伝子基盤に基づいた病態・診断・治療法を、各種遺伝性不整脈疾患の診断基準・重症度分類・日本循環器学会の診療ガイドラインに反映させその普及を行い、医療水準の向上に貢献する。

3. 遺伝性不整脈疾患の遺伝子診断の保険診療化 (平成27年度)

本研究班のメンバーは、平成15年から的高度先進医療による先天性LQTS患者の遺伝子診断(清水)、およ平成18年から厚生労働科学研究費補助金による先天性LQTS患者の多施設登録研究を行い、これらの実績に基づき平成20年4月1日付で先天性LQTS患者の遺伝子診断は保険診療が承認された。しかし、他の遺伝性不整脈疾患については未だに保険診療化されていない。特に小児期の運動中突然死の原因のひとつであるCPVTでは、遺伝子診断率が50-70%と高く、早期の保険診療化を目指す。また、ARVCは、主として右室を拡大・収縮不全を最初に来たし、持続性心室頻拍さらに左室も傷害して難治性心不全を起こす難治性遺伝病であるが、近年のその遺伝的背景が、明らかとされた。すなわち、心筋細胞間の接着に関わるデスモゾーム分子をコードする遺伝子変異が原因で、心筋ナトリウムチャネルの機能障害を続発して、不整脈を起こすことが分かってきた。進行性で突然死や心不全を高率に起こす。その他の遺伝性不整脈疾患についても、本研究班のデータを蓄積することにより保険診療化の足掛かりとする。

(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）に準拠して実施する。また本研究は、申請者・共同研究者がそれぞれの施設の倫理委員会の承認を得ている。本研究では、インフォームド・コンセントの得られた患者から末梢血を採取し、ゲノム DNA を抽出する。患者の血液・ゲノム DNA などのサンプルは、氏名、生年月日、住所などの個人を特定できる情報を取り除き、代わりに患者識別番号でコード化によって、試料や情報の由来する個人を特定できなくする「匿名化」を行う。提供者と新たにつける符号との対応表は個別識別情報管理者が厳重に管理し、個人が特定できない状態で解析を行う。また、患者に遺伝子異常が確認された場合には、患者の同胞についても遺伝子検索をする必要があることがある。その場合にでも十分な説明と同意を得て遺伝子カウンセリングを行う。

C. 研究結果

遺伝性不整脈は、近年、ヒトゲノムプロジェクトをはじめとする分子遺伝学の急速な進歩により明らかとされてきた新しい疾患概念である。すなわち、心臓のイオンチャネルあるいはその関連蛋白をコードする遺伝子の多種多様な変異や一塩基置換 (single nucleotide polymorphism: SNP) により招来される疾患群である。ヒトゲノムプロジェクトは、人類の全ゲノム配列を解読し、その結果、多数の SNP が同定された。ヒトの病気や薬に対する反応性にかかわる遺伝的背景を探るため、2007 年に実施された Hap Map プロジェクトでは、実に 310 万個もの SNP が同定され、その後の Genome Wide Association Study (ゲノムワイド関連解析: GWAS) 成功の鍵となった。しかしながら、ゲノム上の DNA 欠損や重複などの構造的変化の解明については、いまだ研究途上であり、近年の急激な分子生物学的手法の進歩により、これまでの想定異常に多数のゲノムの構造的変化が

存在することが明らかになってきた。その構造的変化の一つが copy number variation (CNV) である。

CNVとは、通常 2 量体として存在する遺伝子のコピー数が変動する現象であり、疾患の発症と関わっていることがごく最近判明してきた。従来の Sanger法では検出できないが、MLPA (Multiplex ligation-dependent Probe Amplification) 法では、real-time PCRを利用してCNVを検出できる。

さて、遺伝性不整脈疾患の中でも、ブルガダ症候群の責任遺伝子は、SCN5A変異が最も多いと報告されているがそれでも我々の研究室を含めて発見率は高々10%程度である。そこで、このSCN5AのCNVが、疾患発症に関連していないかどうかを、MLPA法を用いて、調べた。対象は1996年3月～2015/7月までに、我々がSCN5Aを調べたブルガダ症候群患者のうち、有症状or家族歴ありの150人で、内19名(13%)を除外した131例、うち評価できる結果が得られた120名について、CNVの有無を検索したところ4名(3.3%)にSCN5Aの広汎な欠損や重複が発見された。全例が有症状で、発症年齢も、11, 15, 16, 25才と若く、さらに徐脈性不整脈の合併が見られた。さらに、別グループとして、いわゆるstop codonが入るSCN5A変異あるいはすでに機能解析がされて有意な機能低下があることが示された変異を有する8例を加えて、12例(radical mutation positive)として、CNVの4例を除いた残り116例(SCN5a mutation negative)とを比較検討した。エントリ条件として、有症状or家族歴ありとしたので、当然、この2点では有意差は出なかったが、有症状の中身を見ると室細動や心肺停止が、Radical mutation positive群で有意に多かった(58%vs 22%)。これに対して、原因不明を含めた失神は両群で差が無かった(58% vs 51%)。また有症状例では、その発症年齢がRadical mutation positive群で有意に若かった(28 vs 40才)さらに、遺伝子診断を行った年齢もRadical mutation positive群で有意に若か

った。

Radical mutation positive群では、Sick sinus syndrome (42% vs 5%) あるいは、房室ブロック (92% vs 27%) の合併(overlap症例)が有意に多かった。また、安静時の心電図所見では、Radical mutation positive群において、PQ時間 (221 vs 179 ms)とQRS幅 (120 vs 107 ms) は、有意に長かった。

家族歴でも、Radical mutation positive 群において、Sick sinus syndrome の合併(33% vs 1%)、また、ペースメーカー植え込み例 (42 vs 5%) が、有意に多かった。

D. 考察

欧米でのブルガダ症候群の遺伝子診断は、診断のサポートとしてのみ考えられており、その結果は、治療方針決定には、寄与しないと考えられているが、これには、SCN5A で同定される遺伝的 variant に病的なものとそうでないものが含まれるからである可能性が高い。今回、我々が発見した変異のなかで、いわゆる radical mutations と考えられる群に限って検討すると、有意にその予後は悪く、より積極的に治療加入すべきグループと考えられた。このような観点からの患者さんの臨床評価を行い、治療方針決定にも、大きく寄与できる可能性が示唆された。現在、作成中のガイドラインへも盛り込む形で、班研究を続ける予定である。

E. 結論

今回のコホートは、他の研究と同じく圧倒的に男性が多かったが、その中で、radical mutation positive を疑う症例は、思春期以前に sick sinus syndrome など徐脈性不整脈の合併しており、思春期以降、ブルガダ症候群を発症することがわかってきた。また、高率に AV block を合併し、徐脈性疾患の家族歴もあることが多い。従って、このような症例では、遺伝子診断を進め、その遺伝的背景を明らかにするべきであることが判明した。

予期せぬ、若年での心臓突然死を予防するためにも、重要な点で有り、現在作成中の本邦におけるガイドラインにも記載するべきと考えられた。

F. 研究発表 論文発表

- ① Miyamoto K, Aiba T, Kimura H, Hayashi H, Ohno S, Yasuoka C, Tanioka Y, Tsuchiya S, Yoshida Y, Hayashi H, Tsuboi I, Nakajima I, Ishibashi K, Okamura H, Noda T, Ishihara M, Anzai T, Yasuda S, Miyamoto Y, Kamakura S, Kusano K, Ogawa H, **Horie M**, Shimizu W. Efficacy and safety of flecainide for ventricular arrhythmias in patients with Andersen-Tawil syndrome with KCNJ2 mutation. *Heart Rhythm* 12(3):596-603, 2015
- ② 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. *Clinical Genetics* 87(3):279-283, 2015
- ③ Wada Y, Aiba T, T Matsuyama, I Nakajima, Ishibashi K, Miyamoto K, Yamada Y, Okamura H, Noda T, Satomi K, Morita Y, Kanzaki H, Kusano K, Anzai T, Kamakura S, Ishibashi-Ueda H, Shimizu Wataru, **Horie M**, Yasuda S, Ogawa H. Clinical and Pathological Impact of Tissue Fibrosis for Lethal Arrhythmic Events in Hypertrophic Cardiomyopathy with Impaired Systolic Function. *Circulation Journal* 79(8):1733-41, 2015
- ④ Itoh H, Dochi K, Shimizu W, Ohno S, Aiba T, Kimura H, Kato K, Fukuyama M, Hasegawa K, Schulze-Bahr E, Guicheney P, **Horie M**. A common mutation of long QT Syndrome type 1 in Japan. *Circulation Journal*. 79(9):2026-30. 2015;
- ⑤ Fukuyama M, Ohno S, Makiyama T, **Horie M**. Novel SCN10A Variants Associated with Brugada Syndrome. *Europace*, Apr 4. pii: eu.v078.2015.
- ⑥ Ohno S, Hasegawa K, **Horie M**. Gender differences in the inheritance mode of RYR2 mutations in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia patients. *PLOS One*.10(6): e0131517.2015
- ⑦ Torii S, Arima H, Ohkubo T, Fujiyoshi A, Kadota A, Takashima N, Kadowaki S, Hisamatsu T, Saito Y, Miyagawa N, Zaid M, Murakami Y, Abbott R, **Horie M**, Miura K, Ueshima H. Association between Pulse Wave Velocity and Coronary Artery Calcification in Japanese men: the Shiga Epidemiological Study of Subclinical Atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*; 22(12):1266-77. 2015
- 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. Journal of Japanese College of Cardiology Nov 24. pii: S0914-5087(15)00355-X. 2015

- ⑨ 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, **Horie M**. The genetics underlying acquired long QT syndrome: impact for genetic screening. *European Heart Journal* . 28. pii: ehv695. 2015
- ⑩ Itoh H, Berthet M, Fressart V, Denjoy I, Maugenre S, Klug D, Mizusawa Y, Makiyama T, Hofman N, Shimizu W, Wilde AAM, Schulze-Bahr E, **Horie M**, Tezenas du Montcel S, Guicheney P. Asymmetry of parental origin in Long QT syndrome. Preferential maternal transmission of KCNQ1 variants linked to channel dysfunction *European Journal of Human Genetics*. 16. 2015
- ⑪ Wu J, Ding W-G, **Horie M**. Molecular pathogenesis of long QT syndrome type 1. *Journal of Arrhythmia* (in press)
- ⑫ Ohno S. Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy from the Viewpoint of Genetic Background. *Journal of Arrhythmia* (in press)

学会発表

- ① **Horie M**. Genetic counselling for inherited cardiac arrhythmia. *Cardio Rhythm* 2015 (1.30-2.1 Hong Kong, China)
- ② **Horie M**. Genetics of Early Repolarization Syndromes. Expert Consensus Symposium on J Wave Syndrome (04.21-23, Shanghai, China)
- ③ **Horie M**. Progress in Diagnosis and Treatment of Malignant Ventricular Arrhythmias. Fourth Conference on Severe Heart Diseases in China (06.12-13, Beijing, China)
- ④ Itoh H, Spazzolini C, Crotti L, Aiba T, 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, **Horie M**. The genetics underlying the acquired long QT syndrome. Impact on management. The Heart Rhythm Society's 36th Annual Scientific Sessions (05.13-16, Boston, USA)
- ⑤ Ohno S, Aizawa Y, Fukuyama M, Makiyama T, Kosaki K, Fukuda K, **Horie M**: desmosome gene mutations cause or modify the Brugada syndrome? (05.13-16, Boston, USA)
- ⑥ 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. (05.13-16, Boston, USA)

- ⑦ 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. (06.21-24, Milan, Italy)
- ⑧ Fukuyama M, Ohno S, Ichikawa M, Makiyama T, **Horie M**: SCN10A polymorphisms are associated with the clinical severity of probands with sodium channelopathies. (06.21-24, Milan, Italy)
- ⑨ 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 (8.29-9.2, London, England)
- ⑩ 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 (2015.8.29-9.2, London, England)
- ⑪ Nishiuchi S, Makiyama T, Sasaki K, Kohjima 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 (2015.8.29-9.2, London, England)
- ⑫ 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 (2015.11.7-11, Orlando, FL, U.S.A.)
- ⑬ Ohno S, **Horie M**. Pitfalls in genetic analysis for inherited arrhythmias in the era of next generation sequencer. (2015.11.19-22, Poster, Melbourne, Australia)

G. 知的所有権の取得状況

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

II. 分担研究報告

ブルガダ症候群と早期再分極症候群の類似点と相違点に関する研究

分担研究者 清水 渉 日本医科大学大学院医学研究科 循環器内科学分野 大学院教授

研究要旨: Antzelevitch らは、ブルガダ症候群 (Brugada syndrome: BrS) の ST 上昇と早期再分極症候群 (Early repolarization syndrome: ERS) の J 波の機序は同じであるとし、J 波症候群の概念を提唱している。そこで本研究では、BrS と ERS の疫学、臨床的特徴、心電図学的特徴、電気生理学的特徴、遺伝学的特徴、および薬物治療に対する反応を比較し、その類似点と相違点を自験例および文献的考察から検討した。両症候群は、臨床的特徴、心電図学的特徴、電気生理学的特徴、遺伝学的特徴、および薬物治療に対する反応において、多くの類似点を認め、J 波症候群の概念を支持するものと考えられる。

A. 研究目的

ブルガダ症候群 (Brugada syndrome: BrS) は、12 誘導心電図の V1 から V2 (V3) 誘導での coved 型の ST 上昇を特徴とし、心室細動 (VF) を発症し突然死の原因となる疾患である。一方で、2008 年に Haïssaguerre により報告された早期再分極症候群 (Early repolarization syndrome: ERS) は、同じく VF を呈し、12 誘導心電図で後下壁 (II, III, aVF, I, aVL, V4-V6) 誘導の 2 誘導以上で J 波または ER を認める疾患である。Antzelevitch らは、両症候群の ST 上昇および J 波の機序は心室筋貫壁性の電位勾配で説明可能とし、J 波症候群の概念を提唱している。

本研究では、両症候群の類似点と相違点を自験例および文献的考察から検討した。

B. 研究方法

BrS と ERS の疫学、臨床的特徴、心電図学的特徴、電気生理学的特徴、遺伝学的特徴、および薬物治療に対する反応を比較し、その類似点と相違点を自験例および文献的考察から検討した。

(倫理面への配慮)

倫理面の問題はない。

C. 研究結果

1. 疫学

Type 1 の coved 型 ST 上昇を認める BrS の頻度は、欧米の 0.005~0.1% に対して、日本を含めたアジア地域では、0.15~0.27% と高い。これに対して、J 点で 0.1mV または 0.2mV 以上の J 波を認める頻度は、それぞれ 1~24%、0.6~6.4% と地域差を認めない。

2. 臨床的特徴

性差については、両症候群とも男性に多く (BrS vs. RRS: 76~96 vs. 87%)、診断時の年齢は共に 40 歳代である (41~50 vs. 44 歳)。また、心イベントの発生状況は、共に睡眠中や安静時に多く (82 vs. 49%)、心房細動の合併が比較的多く (19 vs. 23%)、臨床的特徴は両症候群で類似点が多い。

3. 遺伝学的背景

BrS では、これまで *SCN5A* をはじめとする 18 以上の原因遺伝子が同定され、ERS でも 6 つの原因遺伝子が同定されているが、ERS で報

告されている原因遺伝子は、すべて BrS で報告されており、両症候群の遺伝学的背景の類似性を示唆させる。

4. 心電図学的・電気生理学的特徴

BrS の ST 上昇および ERS の J 波は、いずれも VF 発作時の直前直後に増高し、また、先行 RR 間隔が延長した後に増高する傾向がみられる。一方で自験例の検討では、加算平均心電図における遅延電位の陽性率、および電気生理学的検査中の VF 誘発率は、ERS に比べ VF 既往を認める BrS でそれぞれ高い(60 vs. 7%) (88 vs. 0%)。

5. 薬物治療に対する反応

VF 急性期には、両症候群ともに β 受容体刺激薬であるイソプロテレノールの持続点滴が有効である。また、慢性期の VF 発作の予防には、両症候群ともにキニジン、シロスタゾール、ペプリジルの有効性が報告されている。

D. 考察

今回の自験例および文献的考察による BrS と ERS の疫学、臨床的特徴、心電図学的特徴、電気生理学的特徴、遺伝学的特徴、および薬物治療に対する反応の比較検討では、地域差、加算平均心電図における遅延電位の陽性率、電気生理学的検査中の VF 誘発率において両症候群で差を認めた以外は、多くの点において両症候群間で類似点を認めた。遺伝学的背景、および BrS の ST 上昇および ERS の J 波の変化に類似性を認めたこと、さらに、両症候群で有効な薬物は、いずれも一過性外向き電流を減少、あるいは L 型 Ca 電流を増強する薬物であり、BrS の ST 上昇および ERS の J 波の細胞学的成因の類似性を示唆させる所見である。これらは、Antzelevitch らの提唱した J 波症候群の概念を支持するものと考えられる。

E. 結論

ブルガダ症候群と早期再分極症候群は、臨床的特徴、心電図学的特徴、電気生理学的特徴、遺伝学的特徴、および薬物治療に対する反応において、多くの類似点を認める。

F. 研究発表

論文発表

1. **Shimizu W**: Where does heterogeneity exist in ventricular tachyarrhythmias? *Heart Rhythm*. 12(6):1304-1305, 2015
2. ○ Hayashi M, **Shimizu W**, Albert CM: The spectrum of epidemiology underlying sudden cardiac death. *Circ Res*. 116(12):1887-1906, 2015
3. ○ Miyamoto K, Aiba T, Kimura H, Hayashi H, Ohno S, Yasuoka C, Tanioka Y, Tsuchiya T, Yoshida Y, Hayashi H, Tsuboi I, Nakajima I, Ishibashi K, Okamura H, Noda T, Ishihara M, Anzai T, Yasuda S, Miyamoto Y, Kamakura S, Kusano K, Ogawa H, Horie M, **Shimizu W**: Efficacy and safety of flecainide for ventricular arrhythmias in patients with Andersen-Tawil syndrome with KCNJ2 mutations. *Heart Rhythm*. 12(3): 596-603, 2015
4. ○ Shigemizu D, Aiba T, Nakagawa H, Ozaki K, Miya F, Satake W, Toda T, Miyamoto Y, Fujimoto A, Suzuki Y, Kubo M, Tsunoda T, **Shimizu W**, Tanaka T: Exome analyses of long QT syndrome reveal candidate pathogenic mutations in calmodulin-interacting genes. *PLoS One*. 10(7):e0130329, 2015
5. ○ Itoh H, Dochi K, **Shimizu W**, Denjoy I, Ohno S, Aiba T, Kimura H, Kato K, Fukayama M, Hasegawa K, Schulze-Bahr E, Duichenei P, Horie M: A common mutation of long QT syndrome type 1 in Japan. *Circ J*. 79(9):2026-2030, 2015
6. ○ Nakano Y, **Shimizu W**: Genetics of long-QT syndrome. *J Hum Genet*. Epub, 2015

7. ○Kamakura T, Wada M, Nakajim I, Ishibas hi K, Miyamoto K, Okamura H, Noda T, Aiba T, Takaki H, Yasuda S, Ogawa H, **Shimizu W**, Makiyama T, Kamakura S, Kusano K F: Evaluation of the necessity for cardioverter-defibrillator implantation in elderly patients with Brugada syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 8(4):785-791, 2015
8. ○Kamakura T, Wada M, Nakajima I, Ishibashi K, Miyamoto K, Okamura H, Noda T, Aiba T, Takaki H, Yasuda S, Ogawa H, **Shimizu W**, Makiyama T, Kimura T, Nakamura S, Kusano K: Significance of electrocardiogram recording in high intercostal spaces in patients with early repolarization syndrome. *Eur Heart J.* Epub, 2015
9. ○Koizumi A, Sasano T, Kimura W, Miyamoto Y, Aiba T, Ishikawa T, Nogami A, Fukamizu S, Sakurada H, Takahashi Y, Nakamura H, Ishikura T, Koseki H, Arimura T, Kimura A, Hirao K, Isobe M, **Shimizu W**, Miura N, Furukawa T: Genetic defects in a His-Purkinje system transcription factor, IRX3, cause lethal cardiac arrhythmias. *Eur Heart J.* Epub, 2015
10. ○Itoh H, Berthet M, Fressart V, Denjoy I, Maugenre S, Klug D, Mizusawa Y, Makiyama T, Hofman N, Stallmeyer B, Zumhagen S, **Shimizu W**, Wilde AA, Schulze-Bahr E, Horie M, Tezenas du Montcel S, Guicheney P: Asymmetry of parental origin in long QT syndrome: preferential maternal transmission of KCNQ1 variants linked to channel dysfunction. *Eur J Hum Genet.* Epub, 2015
11. ○Funasako M, Aiba T, Ishibashi K, Nakajima I, Miyamoto K, Inoue Y, Okamura H, Noda T, Kamakura S, Anzai T, Noguchi T, Yasuda S, Miyamoto Y, Fukushima Kusano K, Ogawa H, **Shimizu W**: Pronounced shortening of QT interval with mexiletine infusion test in patients with type 3 congenital long QT syndrome. *Circ J.* Epub, 2015
- 学会発表
1. **清水 渉**: 遺伝性不整脈の現状と展望. 企画5 さまざまな移行医療. 第29回日本医学会総会 2015 (関西), 2015.4.12.
 2. **清水 渉**: Update in Inherited Arrhythmia Syndromes. Keynote Lecture. Featured Research Session: Arrhythmia, others. 第79回日本循環器学会学術集会 (大阪), 2015. 4. 26.
 3. **Shimizu W**: International Forum of VA: Session 4 Basic Science-2 Genetic Screening.”Genetics of LQTS. 1st International Forum of Ventricular Arrhythmia. Taiwan. 2015.3.7
 4. **Shimizu W**: Core Curriculum: Arrhythmogenic genetic syndrome: what’s new? Brugada Syndrome: What’s new? Variants of Brugada syndrome: The evolving Picture. 2015 Venice Arrhythmia Venice, Italy. 2015.10.16.
 5. **Shimizu W**: Challenging inherited arrhythmia syndromes: The latest early repolarization syndrome. 2015 APHRS Melbourne, Australia. 2015.11.21
 6. **Shimizu W**: Investigation of sudden cardiac death: Clinical aspects of the genetic investigation of sudden cardiac death. 2015 APHRS Melbourne, Australia. 2015.11.21
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

遺伝子診断に基づく不整脈疾患群の病態解明および診断基準・重症度分類・
ガイドライン作成に関する研究

日本の大規模登録研究におけるBrugada症候群のリスク層別化と長期予後

研究分担者 青沼 和隆

筑波大学医学医療系循環器内科 教授

研究要旨

Brugada 症候群は右側胸部誘導における ST 上昇という特徴的な心電図所見を有し、心室性不整脈による突然死を来しうる症候群である。アジア人男性に多く、本邦における突然死症候群の中でも重要な位置を占めると考えられる。タイプ 1 の Brugada 型心電図を有する心停止・心室細動(VF)からの蘇生例あるいは持続性心室頻拍(VT)の自然発症例は予防的治療として植込み型除細動器 (ICD) の Class I の適応というコンセンサスが得られているが、無症候性例に対する ICD 適応については議論の余地がある。本研究は、日本における多施設共同前向き観察研究である特発性心室細動研究会に登録された 410 例の Brugada 症候群のうち、Heart Rhythm Society (HRS) / European Heart Rhythm Society (EHRS) / Asian Pacific Heart Rhythm Society (APHRS)の 2013 年合同ステートメントに基づき、ICD 適応 Class II に該当する 213 例（平均年齢 53 ± 14 歳、男性 199 例 (93.4%)）を、Class IIa（自発性タイプ 1 かつ失神既往歴）66 例、および Class IIb（自発性または薬剤誘発性タイプ 1 かつプログラム刺激陽性例）147 例に分類し、それぞれの長期予後を検討した。平均 62 ± 34 ヶ月のフォローアップ期間中、Class IIa 群では 8 例(12%、年 2.2%)、Class IIb 群では 4 例(3%、年 0.5%)で心イベントが発生し、Class IIa 群で有意に高率であった ($p=0.01$)。自発性タイプ 1 の症例、あるいは薬剤誘発性タイプ 1 であっても失神を有する症例では心イベント発生率が高い傾向であった。HRS/EHRS/APHRS 2013 年合同ステートメントの Class IIa および Class IIb はリスク層別化に有用であり、失神歴のある自発性タイプ 1 の症例は ICD 適応を前向きに検討すべきと考えられる。

A. 研究目的

Brugada（ブルガダ）症候群は右側胸部誘導における ST 上昇という特徴的な心電図所見を有し、心室細動による突然死を来しうる症候群である。ナトリウムチャンネル SCN5Aをはじめ、カルシウムチャンネル CACNA1C・CACNB2 など数種類の原因遺伝子が報告されており、アジア人男性に多く存在し、本邦

における突然死症候群の中でも重要な位置を占めると考えられる。

2013 年に発表された Heart Rhythm Society (HRS) / European Heart Rhythm Society (EHRS) / Asian Pacific Heart Rhythm Society (APHRS)の合同ステートメントによれば、タイプ 1 の Brugada 型心電図を有する心停止・心室細動(VF)からの蘇生例、お

よび／あるいは持続性心室頻拍(VT)の自然発症例は予防的治療として植込み型除細動器(ICD)のClass Iの適応である。また、自発的なタイプ1のBrugada型心電図を有し、心室性不整脈が原因と思われる失神を来した症例はClass IIa、自発性または薬剤誘発性Brugada型心電図を有し、プログラム刺激でVFが誘発された症例はClass IIbの適応と位置づけられている。心停止やVFから蘇生されたブルガダ症候群は再発頻度が高く、5年間で約40~70%突然死やVFを起こす危険性があり、予防的治療としてICDのClass Iの適応はすでにコンセンサスが得られている。しかしながら、このステートメントにおけるClass IIの適応が、本邦におけるBrugada症候群のICD植込みの適否の判断に有用か否かは十分に検証されていない。

本研究では、日本におけるBrugada症候群の登録研究である特発性心室細動研究会の410例を対象に、HRS/EHRS/APHRSステートメントのClass IIaおよびClass IIbに適合するBrugada症候群の長期予後を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

日本における多施設共同前向き観察研究である特発性心室細動研究会に2002年から2012年までに登録された自発性または薬剤誘発性タイプ1 Brugada 症候群の発端者 410例を対象とした。そのうち HRS/EHRS/APHRS 2013 年合同ステートメントで Class IIa の ICD 適応 66 例と Class IIb の ICD 適応 147 例の計 213 例を対象とした。

登録者は心イベント(心室性不整脈に対するICD適切作動、VTまたはVF)の発生について12か月毎にフォローされ、Class IIa および Class IIb の Brugada 症候群患者における長期予後を比較検討した。

C. 研究結果

特発性心室細動研究会に登録された Brugada 症候群 410 例の平均年齢は 52 ± 14 歳であり、男性は 382 例 (93.2%) であった。そのうち HRS/EHRS/APHRS 合同ステートメントの ICD 適応 Class II に適合する患者は 213 例 (平均年齢 53 ± 14 歳、男性 199 例 (93.4%) で、Class IIa 適合者 66 例、Class IIb 適合者 147 例であった。

Class IIa および Class IIb の各群の臨床的背景において、年齢、性別には有意差が認められなかった。合同ステートメントに基づき、Class IIa 群では全例、自発性のタイプ 1 Brugada 型心電図を呈し、また失神の病歴を有しており、一方、Class IIb 群では全例、プログラム刺激で VT/VF が誘発された。両群間で突然死の家族歴、心房細動の病歴、QRS 間隔、QTc 時間、J 波の合併などに有意差は認められなかった。

フォローアップ期間は平均 62 ± 34 ヶ月 (Class IIa 群 67 ± 41 ヶ月、Class IIb 群 60 ± 31 ヶ月、 $p=0.20$) であった。Class IIa 群では 8 例(12%)、Class IIb 群では 4 例(3%)で心イベントが発生し、Class IIa 群で有意に高率であった ($p=0.01$) (図)。心イベント発生率は Class IIa 群で年 2.2%、Class IIb で 0.5% であった。

Class IIa 群 66 例のうち、プログラム刺激で VT/VF が誘発された 40 例の心イベント発生率は年 2.2% (5 例)、突然死の家族歴を有する 8 例の心イベント発生率は年 2.2% (1 例)、他のリスク因子のない 12 例は年 3.3% (2 例) のイベント発生率であった。Class IIb 群 147 例のうち、失神の病歴のある 20 例の心イベント発生率は年 1.3% (1 例)、自発性タイプ 1 を呈する 48 例の心イベント発生率が年 0.8% (2 例)、自発性タイプ 1 かつ突然死の家族例を有する 22 例の心イベント発生率が年 0.9%

(1例)であり、他のリスク因子のない32例はイベント発生率が0%であった。

D. 考察

日本におけるBrugada症候群の多施設大規模コホートを用いた本研究では、心イベント(VT/VF)の既往のないタイプ1 Brugada型心電図を有する症例のうち、HRS/EHRS/APHRSの2013年合同ステートメントのICD植込み Class IIa の適応に該当する症例(失神例)では、平均約5年の観察期間における心イベント発生率が年2.2%であり、Class IIbに該当する症例(プログラム刺激陽性例)の年0.5%と比較して、有意に高率であった。このことからこの合同ステートメントがBrugada症候群の中リスクおよび低リスクの層別化に有用であることが示唆された。また、失神の既往のない場合でも、自発性タイプ1 Brugada型心電図を有する例では年0.8%と心イベントのリスクがやや高い傾向にあることが示唆された。一方、失神歴・家族歴がなく、薬剤誘発性タイプ1症例では心イベントの発生はなく、たとえプログラム刺激陽性例でも予後は比較的良好と考えられた。しかしながら、Brugada症候群症例のリスク層別化とICD適応の判断についてはさらなる長期的な観察が必要である。

E. 結論

VT/VFの既往のないタイプ1 Brugada型心電図を有する症例のうち、HRS/EHRS/APHRSの2013年合同ステートメントのICD植込み Class IIa の適応に該当する症例(失神例)では、平均約5年の観察期間における心イベント発生率が年2.2%であり、Class IIbに該当する症例(プログラム刺激陽性例)の年0.5%と比較して、有意に高率であった。失神の有無および自発性タイプ1

心電図の有無が、Brugada症候群の中リスクおよび低リスクの層別化に有用であることが示唆された。

(参考論文)

1) Priori SG, Wilde AA, Horie M, et al. HR S/EHRA/APHRS Expert Consensus Statement on the Diagnosis and Management of Patients with Inherited Primary Arrhythmia Syndromes. *Heart Rhythm*, 10(12), 1932-1963, 2013.

F. 研究発表

論文発表

1) Naruse Y, Nogami A, Harimura Y, Ishibashi M, Noguchi Y, Sekiguchi Y, Sato A, Aonuma K. Difference in the Clinical Characteristics of Ventricular Fibrillation Occurrence in the Early Phase of an Acute Myocardial Infarction Between Patients With and Without J Waves. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 26(8):872-8, 2015.

2) Soejima K, Nogami A, Sekiguchi Y, Harada T, Satomi K, Hirose T, Ueda A, Miwa Y, Sato T, Nishio S, Shirai Y, Kowase S, Murakoshi N, Kunugi S, Murata H, Nitta T, Aonuma K, Yoshino H. Epicardial catheter ablation of ventricular tachycardia in no entry left ventricle: mechanical aortic and mitral valves. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 8(2):381-9, 2015.

3) Igarashi M, Nogami A, Sekiguchi Y, Kuroki K, Yamasaki H, Machino T, Yui Y, Ogawa K, Talib AK, Murakoshi N, Kuga K, Aonuma K. The QRS morphology pattern in V5R is a novel and simple parameter for differentiating the origin of idiopathic outflow tract ventricular

arrhythmias. *Europace*. 17(7):1107-16, 2015.

○4) Takagi M, Sekiguchi Y, Yokoyama Y, Aihara N, Hiraoka M, Aonuma K; Japan Idiopathic Ventricular Fibrillation Study (J-IVFS) Investigators. Long-term prognosis in patients with Brugada syndrome based on Class II indication for implantable cardioverter-defibrillator in the HRS/EHRA/APHS Expert Consensus Statement: Multicenter study in Japan. *Heart Rhythm*. 11:1716-20, 2014.

5) Naruse Y, Tada H, Harimura Y, Ishibashi M, Noguchi Y, Sato A, Hoshi T, Sekiguchi Y, Aonuma K. Early repolarization increases the occurrence of sustained ventricular tachyarrhythmias and sudden death in the chronic phase of an acute myocardial infarction. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 7(4):626-32, 2014.

6) Ruwald MH, Okumura K, Kimura T, Aonuma K, Shoda M, Kutuyifa V, Ruwald AC, McNitt S, Zareba W, Moss AJ. Syncope in high-risk cardiomyopathy patients with implantable defibrillators: frequency, risk factors, mechanisms, and association with mortality: results from the multicenter automatic defibrillator implantation trial-reduce inappropriate therapy (MADIT-RIT) study. *Circulation*. 129(5):545-52, 2014.

7) 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 ventric

ular fibrillation with a focus on J waves. *Heart Rhythm*. 2014 Dec;11(12):2261-6

学会発表

1) Masahiko Takagi, Yukio Sekiguchi, Yasuhiro Yokoyama, Naohiko Aihara, Masayasu Hiraoka, Kazutaka Aonuma; The Japan Idiopathic Ventricular Fibrillation Study (J-IVFS) Investigators. The prognostic value of early repolarization (ER) and ST-segment morphology following the ER in Brugada syndrome: Multicenter study in Japan. The 30th annual Meeting of The Japanese Heart Rhythm Society (京都) 2015, 7, 30

2) Eikou Sai, Miyako Igarashi, Yasutoshi Shinoda, Kojiro Ogawa, Mitsuhiro Fukata, Ahmed Talib, Keita Masuda, Yoshiaki Yui, Takeshi Machino, Kenji Kuroki, Yukio Sekiguchi, Akihiko Nogami, Kazutaka Aonuma. Long-term outcome of the patients with and without structural heart disease: Impact of VT/VF induction on appropriate ICD therapy. The 30th annual Meeting of The Japanese Heart Rhythm Society (京都) 2015, 7, 28-31.

3) M. Takagi, Y. Sekiguchi, Y. Yokoyama, N. Aihara, M. Hiraoka, K. Aonuma. Lack of an additional prognostic value of programmed electrical stimulation for risk stratification in Brugada patients without previous cardiac arrest: J-IVFS study.

4) Aonuma K. How to treat ventricular fibrillation caused by CPVT. OCC2015 (上海) 2015,9,12

5) Aonuma K. What we should know for successful VT ablation - Tips and tricks for successful VT ablation. Asian Pacific Heart Rhythm Society (Seoul) 2015,10,30.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

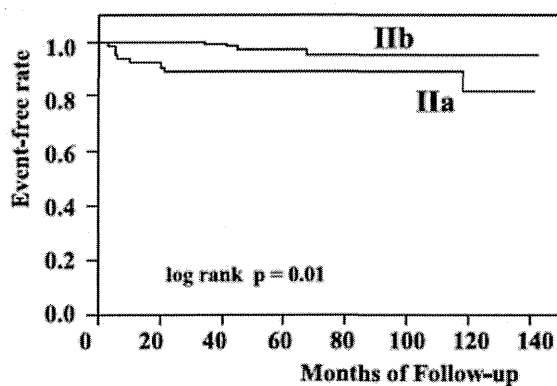
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図 イベントフリー生存曲線



Number at risk

Class IIa	66	59	48	36	20	17	12	3
Class IIb	147	137	112	57	35	22	9	3

遺伝子診断に基づく不整脈疾患群の病態解明および診断基準・重症度分類・
ガイドライン作成に関する研究

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)の新規疾患遺伝子を網羅的遺伝学研究手法で解明した。日本人 PCCD 大家系の罹患者 10 人でゲノムワイド SNP タイピングを行い、疾患遺伝子を染色体 2q の 2500 万塩基領域に特定した。次に罹患者 3 人・非罹患者 1 人で全エクソン解析を行い、この領域に存在する罹患者に共通のレアバリエーションとして、タイチン(*TTN*)のスプライシング変異を同定した。この変異は多型データベースに登録がない停止コドンをもたらす短縮型変異で家族 15 人で表現型・遺伝型が完璧に一致していた。さらに遺伝子変異陰性の日本人 PCCD 9 家系で、*TTN* を含む 459 遺伝子のターゲットエクソン解析を行ったところ、1 家系に *TTN* の I バンド領域にナンセンス変異を同定した。以上の研究から、巨大サルコメア遺伝子 *TTN* は PCCD の新規原因遺伝子であると考えられた。

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、これまで心筋チャンネル遺伝子(*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 大家系に着目し（突然死 2 例、ペースメーカー植え込み 5 名、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 タイピングを行い、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・サンガーシーケンス

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)でシーケンスを解析した。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、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 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 法を用い 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)