

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））
総括研究報告書

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、Brugada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。Brugada症候群の調査研究（H22-難治一般-144）から、日本人のBrugada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年以来、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、Brugada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Brugada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年からの高度先進医療による先天性LQTS患者の遺伝子診断(清水)、および平成18年からの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ン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(BrS)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BrS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、有症状の中身をみると室細動や心肺停止が、Radical mutation positive群で有意に多かった(58% v s 22%)。これに対して、原因不明を含めた失神は両群で差がなかった

(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、P Q時間(221 vs 179 ms)とQ R S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に病的な者と相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

1. 論文発表

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

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

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

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;

Fukuyama M, Ohno S, Makiyama T, **Horie M**. Novel SCN10A Variants Associated with Brugada Syndrome. Europace, Apr 4. pii: eu078.2015.

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

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

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

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

Itoh H, Berthet M, Fressart V, Denjoy I, Maugendre 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

Wu J, Ding W-G, **Horie M**. Molecular pathogenesis of long QT syndrome type 1. Journal of Arrhythmia (in press)

Ohno S. Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy from the Viewpoint of Genetic Background. Journal of Arrhythmia (in press)

1. 学会発表

Horie M. Genetic counselling for inherited cardiac arrhythmia. Cardio Rhythm 2015(1.30-2.1 Hong Kong, China)

Horie M. Genetics of Early Repolarization Syndromes. Expert Consensus Symposium on J Wave Syndrome (04.21-23, Shanghai, China)

Horie M. Progress in Diagnosis and Treatment of Malignant Ventricular Arrhythmias. Fourth Conference on Severe Heart Diseases in China (06.12-13, Beijing, China)

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)

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)

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)

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)

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)

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)

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)

Nishiuchi S, Makiyama T, Sasaki K, Kohjitani 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)

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.)

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

