

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））  
（分担）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) 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 1,887 個を、さらに、理研の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低アレル頻度(1%以下)のバリエーションが 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 である。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見られるタグ SNP の可能性が高いと考えられた。もう一つ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 11 人・非罹患者 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、停止コドンをきたす 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 1,887 個を、理研の日本人全ゲノムデータベース(BBJ-WGS\_1K)でさらにフィルタリングしたところ、185 個に狭まり、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 家系を解析したところ、一家系に *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きた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* の短縮型変異をきたす変異が同定された。そのうち家系 A に見られた変異は、家族 15 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ものは、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。エクソン 363 個をもつ巨大遺伝子 *TTN* をサンガ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

○1. 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, 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. Maharani 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

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.

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。

G . 知的所有権の取得状況  
なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

## 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
石川泰輔 蒔田直昌	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
蒔田直昌	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
蒔田直昌	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 リニカルクエ スション	診断と治 療社	東京	2015	162-163
蒔田直昌	Progressive cardiac conduction disturbance (PCCD)とは？	平尾見三 笹野哲郎	不整脈診療ク リニカルクエ スション	診断と治 療社	東京	2015	164-165
蒔田直昌	QT短縮症候群と は？	平尾見三 笹野哲郎	不整脈診療ク リニカルクエ スション	診断と治 療社	東京	2015	166-167
蒔田直昌	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 リニカルクエ スション	診断と治 療社	東京	2015	167-168

## 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
Daomy 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, 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	<i>Int J Cardiol</i>	207	349-358	2016

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.	<i>Int Cardiol J</i>	190	393-402	2015
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	<i>Circ Arrhythm Electrophysiol</i>	8(5)	1095-1104	2015
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.	<i>Circ Arrhythm Electrophysiol</i>	8(2)	400-408	2015
Ishikawa T, Tsuji Y, Makita N.	Inherited bradyarrhythmia: A diverse genetic background.	<i>J Arrhythm.</i>	In press		2015
Maharani 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.	<i>Circ J</i>	79(12)	2659-2668	2015
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.	<i>J Am Coll Cardiol</i>	66(18)	1976-1986,	2015.