

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 萩原 誠久 東京女子医科大学病院 循環器内科

研究要旨 洞不全症候群、先天性房室ブロックは、その原因として SCN5A, HCN4, ANK2, LMNA, MYH6 遺伝子等の異常が報告されているが、多くの症例では原因不明である。当院の症例で、3 世代にわたり先天性房室ブロックの経過中に心房停止を発症した家系について、遺伝子及び機能解析を行った結果、新たな遺伝子変異と病態との関連が発見されたので報告する。

A．研究目的

先天性房室ブロックに心房停止を発症した家系の特徴的臨床像と、遺伝子解析及び異常遺伝子の機能解析。

B．研究方法

1. 遺伝子解析：罹患者及び非罹患者の末梢白血球よりゲノムを抽出し、心疾患や心電図情報に関連する 459 遺伝子のエクソン領域に対し HiSeq2500 で網羅的シーケンズを行った。更にサンガー法によってパリエーションを確認し、dnSNP や日本人特異的多形データベースなどに登録のないものを新規範囲と推定した。サンガー法による確認では、54 個のパリエーションが該当したが、機能的な側面から *GJC1* (コネキシン 45 (Cx45) をコードする) 遺伝子を原因遺伝子と推定した。

2. 機能解析：チャンネルの形成能の評価：蛍光 myc タグを付加した野生型及び変異 Cx45 を N2A 細胞にトランスフェクションし、蛍光顕微鏡を用いてプラーク形成を観察した。

細胞電気生理学的検討：N2A 細胞に野生型および変異 Cx45 を導入したプラスミドをトランスフェクションし、ペアになった二つの

細胞を選び、ホールセルダブルパッチクランプ法を用いてチャンネルのコンダクタンスや電位依存性を検討し、比較した。Cx45KO マウスを用いた電気生理学的検討：Tamoxifen 投与により Cx45 が KO されるマウスを用いて、体表面心電図及び食道ペーシングによる洞結節、房室結節の機能評価を行った。

（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。研究分担者は当大学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罹患者及びその家族のみから末梢血を採取し、ゲノム DNA を抽出した。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することによって、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った。

マウスを用いた研究については、東京女子医大動物実験倫理委員会の承認を得て実験を行った。

C . 研究結果

臨床像：発端者は20歳女性。6歳時、学校健診の心電図で異常を指摘され、近医を受診したところ、I度房室ブロックとMobitz型II度房室ブロックを指摘されたが、症状はなく経過観察となった。11歳頃より心電図で房室解離が出現し、13歳で運動中に動悸と眩暈が出現した。14歳で入浴後失神し、入院精査ではP波が消失して心房停止の状態であり、電気生理学的検査で心房の電位がほとんど認められず、房室ブロックと心房停止の診断で人工ペースメーカー(VVI)の植込みを行った。

母方の祖父は37歳、母は17歳時に、それぞれ洞不全症候群、房室ブロック+心房停止の診断にて人工ペースメーカー植込みを行っている。弟(17歳)も発端者と同様の経過を辿って現在心房停止であるが、無症状のため経過観察されている。

1. 遺伝子解析：75番目のアルギニンがヒスチジンに変異(R75H)しており、今までに報告のない新規変異と考えられる。
2. 機能解析：R75Hは野生型同様に細胞間にプラークを形成した。膜輸送能、チャンネル形成能は障害されていないことが確かめられた。R75Hはチャンネルのカップリング確率がホモで0%、ヘテロで72.7%(野生型100%)に低下しており、コンダクタンスもヘテロで5.0 nS(野生型24.2 nS)と有意に低下していた。Cx45KOマウス(tamoxifen投与後)は、コントロール(tamoxifen投与前)に比較して、心電図には有意な変化を認めなかったが、洞結節回復時間(SNRT)が 195.3 ± 10.0 msから 226.1 ± 11.6 ms ($p=0.03$)、補正洞結節回復時間(CSNRT)が 67.2 ± 9.3 msから 95.4 ± 11.2 ms ($p=0.04$)に延長しており、この変化は週齢10週未満の若いマウスにのみ認められた。

D . 考察

Cx45はギャップジャンクションチャンネルの構造蛋白の一つであり、心臓に於いては、胎生期に最初に発現するCxとして知られている。その分布は心臓全体に及ぶが、胎齢が進むにつれてその分布は縮小し、Cx43、Cx40などの別のCxが作業心筋に広く分布するようになる¹。出生時には、Cx45は刺激伝導系のみに限局して存在する。胎生期にCx45をノックアウトすると、心内膜床欠損、房室ブロックにより心不全となり胎児死亡する²ため、Cx45の出生後の役割については現在まで明らかにされていなかった。

今回発見された*GJC1*遺伝子の変異について、*in vitro*の実験によって、チャンネル蛋白の膜輸送・形成が正常である一方、その機能が著しく障害されていることが新たにわかった。R75はチャンネルポアの内面を構成するアミノ酸ではないが³、R75の変異でチャンネル形成は正常ながらチャンネル機能が変化したという報告が幾つかあり^{4,5}、我々の実験結果と一致している。Cx45を成体においてノックアウトする*in vivo*での実験では、洞結節の機能が低下することが示され、この点はR75H変異を持つ家系の臨床像と一致する。しかしながら、マウスにおいては明らかな房室ブロックはみられておらず、ヒトの臨床例のモデルとするには限界があることもわかった。これは、マウスとヒトのCx45の電位依存性が異なること⁶、Cx45の機能の障害の程度が、ヒトの症例とCx45KOマウスでは異なることなどが関与していると考えられる。しかし少なくとも、Cx45は成体心臓において、洞結節機能に関与していることが示唆された。

E . 結論

家族性先天性房室ブロックと心房停止を呈する症例において新規に発見された*GJC1*

遺伝子 R75H 変異について、機能解析を行った。R75H は野生型に比較して、チャネル蛋白の膜への輸送やチャネル形成は正常であるが、チャネル機能は著しく障害されていた。また、Cx45 をマウス成体でノックアウトしたところ、週齢 10 週未満のマウスで洞結節機能の低下がみられ、Cx45 は成体、特に若年において、洞結節機能に關与している可能性が示唆された。GJC1R75H 変異は、先天性房室ブロックに心房停止を合併する症例に於いてその病態に關与していると考えられ、今後このような症例に対しては、候補遺伝子として GJC1 についても検索する必要があると思われる。

<参考文献>

1. Alcolea, S., *et al.* Replacement of connexin40 by connexin45 in the mouse: impact on cardiac electrical conduction. *Circulation research* **94**, 100-109 (2004).
 2. Kumai, M., *et al.* Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. *Development* **127**, 3501-3512 (2000).
 3. Maeda, S., *et al.* Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Nature* **458**, 597-602 (2009).
 4. Abrams, C.K., *et al.* Functional requirement for a highly conserved charged residue at position 75 in the gap junction protein connexin 32. *The Journal of biological chemistry* **288**, 3609-3619 (2013).
 5. Paznekas, W.A., *et al.* Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *American journal of human genetics* **72**, 408-418 (2003).
 6. Barrio, L.C., Capel, J., Jarillo, J.A., Castro, C. & Revilla, A. Species-specific voltage-gating properties of connexin-45 junctions expressed in *Xenopus* oocytes. *Biophysical journal* **73**, 757-769 (1997).
- F. 研究発表
1. 論文発表
 1. Nishii K, Seki A, Kumai M, Morimoto S, Miwa T, Hagiwara N, Shibata Y, Kobayashi Y. Connexin45 contributes to global cardiovascular development by establishing myocardial impulse propagation. *Mech Dev.* 2016 Feb 23. pii: S0925-4773(16)30006-5. doi: 10.1016/j.mod.2016.02.003. [Epub ahead of print]
 2. Haruki S, Minami Y, Hagiwara N. Stroke and Embolic Events in Hypertrophic Cardiomyopathy: Risk Stratification in Patients without Atrial Fibrillation. *Stroke.* 2016 Apr;47(4):936-42. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.012130. Epub 2016 Mar 3.
 3. Minami Y, Haruki S, Yashiro B, Suzuki T, Ashihara K, Hagiwara N. Enlarged left atrium and sudden death risk in hypertrophic cardiomyopathy patients with or without atrial fibrillation. *J Cardiol.* 2016 Feb 20. pii: S0914-5087(16)00017-4. doi: 10.1016/j.jjcc.2016.01.006. [Epub ahead of print]
 4. Ejima K, Kato K, Iwanami Y, Henmi R, Yagishita D, Manaka T, Fukushima K, Arai

K, Ashihara K, Shoda M, Hagiwara N. Impact of an empiric isolation of the superior Vena cava in addition to circumferential pulmonary vein isolation on the outcome of paroxysmal atrial fibrillation ablation. *Am J Cardiol*. 2015 Sep 10. pii: S0002-9149(15)01919-0. doi: 10.1016/j.amjcard.2015.09.005. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26434513.

5. Ogiso M, Suzuki A, Shiga T, Nakai K, Shoda M, Hagiwara N. Effect of intravenous amiodarone on QT and T peak-T end dispersions in patients with nonischemic heart failure treated with cardiac resynchronization-defibrillator therapy and electrical storm. *J Arrhythm*. 2015 Feb;31(1):1-5. doi: 10.1016/j.joa.2014.01.006. Epub 2014 Apr 3.

2. 学会発表

1. Akiko Nishii, Taisuke Ishikawa, Xavier Daumy, Mari Urano, Kayoko Saito, Kiyomasa Nishii, Yosaburo Shibata, Yasushi

Kobayashi, Jean-Jacques Schott, Richard Redon, Vincent Probst, Nobuhisa Hagiwara, Naomasa Makita. A novel connexin 45 mutation responsible for cardiac conduction disturbance demonstrated by next generation sequencing and recapitulated by conditional knockout mice. 第80回日本循環器学会総会、2016.3.18. 仙台市民会館

2. Akiko Seki, Nobuhisa Hagiwara. Impact of connexin45 knockout on the cardiac conduction system in different age adult mice. 第30回日本不整脈学会学術大会・第32回日本心電学会学術集会 2016.7.2.京都国際会議場

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

特になし

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

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
Nishii K, Seki A, Kumai M, Morimoto S, Miwa T, Hagiwara N, Shibata Y, Kobayashi Y.	Connexin45 contributes to global cardiovascular development by establishing myocardial impulse propagation.	Mech Dev.	S0925-4773(16)	30006-5. [Epub ahead of print]	2016
Haruki S, Minami Y, Hagiwara N.	Stroke and Embolic Events in Hypertrophic Cardiomyopathy: Risk Stratification in Patients without Atrial Fibrillation.	Stroke.	47(4)	936-42.	2016
Minami Y, Haruki S, Yashiro B, Suzuki T, Ashihara K, Hagiwara N.	Enlarged left atrium and sudden death risk in hypertrophic cardiomyopathy patients with or without atrial fibrillation.	J Cardiol.	S0914-5087(16)	00017-4. [Epub ahead of print]	2016
Ejima K, Kato K, Iwanami Y, Henmi R, Yagishita D, Manaka T, Fukushima K, Arai K, Ashihara K, Shoda M, Hagiwara N.	Impact of an empirical isolation of the superior Vena cava in addition to circumferential pulmonary vein isolation on the outcome of paroxysmal atrial fibrillation ablation.	Am J Cardiol.	S0002-9149(15)	01919-0. [Epub ahead of print]	2015
Ogiso M, Suzuki A, Shiga T, Nakai K, Shoda M, Hagiwara N.	Effect of intravenous amiodarone on QT and T peak-T end dispersions in patients with nonischemic heart failure treated with cardiac resynchronization-defibrillator therapy and electrical storm.	J Arrhythm.	31(1)	1-5.	2015