

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 教授

研究要旨：進行性心房伝導障害の原因遺伝子を解明するために、原因遺伝子不明の日本人洞不全症候群・房室ブロック 31 家系に対して心疾患関連 457 遺伝子のターゲットエクソン解析をおこない、ヨーロッパの孤発性房室ブロック 15 家系に対してトリオ全エクソン解析を行った。その結果、進行性の房室ブロックと心房静止を特徴とする血縁関係のない日仏 2 家系にコネキシン 45(Cx45)の同一変異 p.R75H を同定した。キャリアは共通して、進行性の房室ブロック・心房静止とともに、頭蓋顔面骨格異常と歯手指骨格異常を合併していた。Cx45-R75H のギャップ結合ヘミチャネルやブランク形成は正常だったが、細胞間コミュニケーション機能は著明に障害されていた。また心臓特異的 Cx45 ヘテロノックアウトマウスは、洞機能異常と心房不整脈を示した。Cx45 遺伝子 *GJCI* は、顔面頭蓋骨・歯・手指形骨成異常を伴う進行性心房伝導障害という、新規の遺伝性不整脈の原因遺伝子である。

A．研究目的

遺伝性心臓伝導障害は心筋活動電位の伝播に影響を与える様々な遺伝子の変異に起因する除脈性不整脈である。刺激伝導系に限局する伝導障害を主な兆候とするものが多く、心臓外の異常を伴う症候性の症例は少ない。また遺伝性心臓伝導障害の中には心室内伝導障害を伴わない(narrow QRS)房室ブロックを特徴とする群(進行性心房伝導障害)があるが、その原因遺伝子は解明されていない。本研究の目的は、進行性心房伝導障害の新規原因遺伝子を解明し、その機能異常を *in vitro*・*in vivo* で解明することである。

B．研究方法

進行性心房伝導障害の新規原因遺伝子を解析するために、既知の疾患遺伝子に変異のない家系に対して次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を行った。日本人家族性洞不全症候群と房室ブロック(31 家系)に対しては心疾患関連 457 遺伝子のターゲットエクソン解析を行い、ヨーロッパの孤発性房室ブロック(15 家系)について母体由来の SS-A/Ro・SS-B/La 自己抗体陰性の発端者と両親のトリオ全エクソン解析を

行った。ギャップ結合変異の機能異常を *in vitro* で評価するために、正常および変異 cDNA プラスミドを N2a 細胞にトランスフェクションし、ダブル whole-cell パッチクランプで細胞間コンダクタンスを定量するとともに、ギャップ結合を形成する細胞ペアの片側に蛍光色素 Lucifer yellow を微小注入し、色素の細胞間移動速度を定量した。またギャップ結合変異の *in vivo* 機能評価のために Tamoxifen 誘導心臓特異的ノックアウトマウスを作成し、カテーテルも用いて洞結節・房室結節の電気生理学的解析を行った。(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 25 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成 18 年 6 月 1 日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)に準拠して実施した。

C.結果

心室内伝導障害を伴わない進行性の房室ブロックと心房静止を特徴とする血縁関係のない 2

家系(3世代の日本人家系とフランス人孤発例)にギャップ結合コネクシン45(Cx45)遺伝子*GJC1*上の同一のミスセンス変異R75Hを同定した。変異キャリアは共通して、進行性の房室ブロック・心房静止とともに、短顔症、屈指症・斜指症、小歯症・永久歯欠損という頭蓋顔面骨格・歯・手指骨格異常を合併していた。

Cx45変異R75Hはヘミチャネルやギャップ結合プラーク形成に異常を示さなかったが、細胞間コンダクタンスとLucifer yellowの細胞間移動能は著明に障害されていた。これはR75H変異がギャップ結合による細胞間コミュニケーションをドミナントネガティブに抑制していることを意味する。またTamoxifen誘導心臓特異的*Gjc1*ヘテロノックアウトマウスは、洞機能異常と心房不整脈を示し、変異キャリアにみられる心房内伝導障害と同様の所見であると考えられた。

D. 考察

心臓伝導障害(CCD)は、加齢や手術の合併症や薬剤毒性などに伴う二次的な機能的変化としてみられることが多いが、一部に明白な家族内発症を示すものもある。家族性CCDの原因遺伝子としては、いくつかの心筋イオンチャネル・膜アダプタータンパク・転写因子・核膜タンパク・ギャップ結合などが報告されている。CCDの多くは経過とともに心電図QRS幅の延長を特徴とする心室内伝導障害を示す。一方、本研究の2家系で明らかになったCx45の変異キャリアの伝導障害は、心室内伝導障害のない、心房と房室結節に局限した心房性進行性伝導障害であり、同時に顔面頭蓋形成異常・歯手指形成異常を伴う極めてまれな症候群である。

ギャップ結合は心筋細胞同士を電気的に結合し、心臓全体に活動電位が適切に伝播する役割を演じている。心臓にはCx40, Cx43, Cx45という発現分布・電気生理学的特性の異なる3つのアイソフォームが存在する。Cx43は心房・心室に強く発現し、眼歯指形成異常(ODDD)の原因遺伝子

である。一方Cx45は、主として洞結節・房室結節に発現する低コンダクタンスのギャップ結合である。Cx45変異R75Hはサブユニット6量体によるヘミチャネル形成や、ギャップ結合の細胞膜への集簇には異常はなかったが、イオンや小物質の透過性がdominant negativeに抑制されていた。心臓特異的Cx45ノックアウトマウスで見られた洞機能異常と心房不整脈はヒトCx45変異キャリアの心房内伝導障害をよく反映していた。一方、骨芽細胞の多細胞ネットワークにはCx43とCx45を介して細胞間コミュニケーションが重要な役割を果たしていることが知られている。Cx45の変異R75Hは骨マトリックスタンパクと石灰化にも異常をきたし、頭蓋骨・手指骨・歯の形成異常をもたらしたものと推測される。

E. 結論

Cx45変異R75Hは、顔面頭蓋骨・歯・手指骨の形成異常を伴う進行性心房伝導障害という、新規の遺伝性不整脈の原因遺伝子変異である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kozasa Y, Nakashima N, Ito M, Ishikawa T, Kimoto H, Ushijima K, Makita N, Takano M. HCN4 pacemaker channels attenuate the parasympathetic response and stabilize the spontaneous firing of the sinoatrial node. *J Physiol* 596(5):809-825, 2018.
2. Yamamoto Y, Makiyama T, Harita T, Sasaki K, Wuriyanghai Y, Hayano M, Nishiuchi S, Kohjitani H, Hirose S, Chen J, Yokoi F, Ishikawa T, Ohno S, Chonabayashi K, Motomura H, Yoshida Y, Horie M, Makita N, Kimura T. Allele-specific ablation rescues electrophysiological abnormalities in a human iPS cell model of long-QT syndrome with a *CALM2* mutation. *Hum Mol Genet* 26(9):1670-1677, 2017.
3. Yamagata K, Horie M, Aiba T, Ogawa S, Aizawa Y, Ohe T, Yamagishi M, Makita N, Sakurada H, Tanaka T, Shimizu A, Hagiwara N, Kishi R, Nakano Y, Takagi M, Makiyama T, Ohno S, Fukuda K, Watanabe H, Morita H, Hayashi K, Kusano K, Kamakura S, Yasuda S, Ogawa H, Miyamoto Y, Kapplinger JD, Ackerman MJ, Shimizu W. Genotype-phenotype correlation of *SCN5A* mutation

for the clinical and electrocardio-graphic characteristics of probands with Brugada syndrome: A Japanese multicenter registry. *Circulation* 135(23):2255-2270, 2017.

4. Seki A, Ishikawa T, Daumy X, Mishima H, Barc J, Sasaki R, Nishii K, Saito K, Urano M, Ohno S, Otsuki S, Kimoto H, Baruteau AE, Thollet A, Fouchard S, Bonnaud S, Parent P, Shibata Y, Perrin JP, Le Marec H, Hagiwara N, Mercier S, Horie M, Probst V, Yoshiura KI, Redon R, Schott JJ, Makita N. Progressive atrial conduction defects associated with bone malformation caused by a connexin-45 mutation. *J Am Coll Cardiol* 70(3):358-370, 2017.
5. Ishikawa T, Ohno S, Murakami T, Yoshida K, Mishima H, Fukuoka T, Kimoto H, Sakamoto R, Ohkusa T, Aiba T, Nogami A, Sumitomo N, Shimizu W, Yoshiura KI, Horigome H, Horie M, Makita N. Sick sinus syndrome with *HCN4* mutations shows early onset and frequent association with atrial fibrillation and left ventricular noncompaction. *Heart Rhythm*

thm 14(5):717-724, 2017.

2. 学会発表
1. Makita N. Genetic and Biophysical Basis of Calmodulinopathy, and Functional Rescue by Genome-Editing in Patient-Derived iPSC Cardiomyocytes. 20th International Symposium on Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease; 2017/10/24; Awaji, Hyogo.
2. Makita N. Genetic Mutation of Brugada Syndrome. Heart Rhythm Society Scientific Sessions; 2017/5/11; Chicago, USA.
3. Makita N. Brugada Syndrome: Basic and Clinical Updates, Advancement of Basic Research. 13th Annual Congress European Cardiac Arrhythmia Society; 2017/4/3; Rome.

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

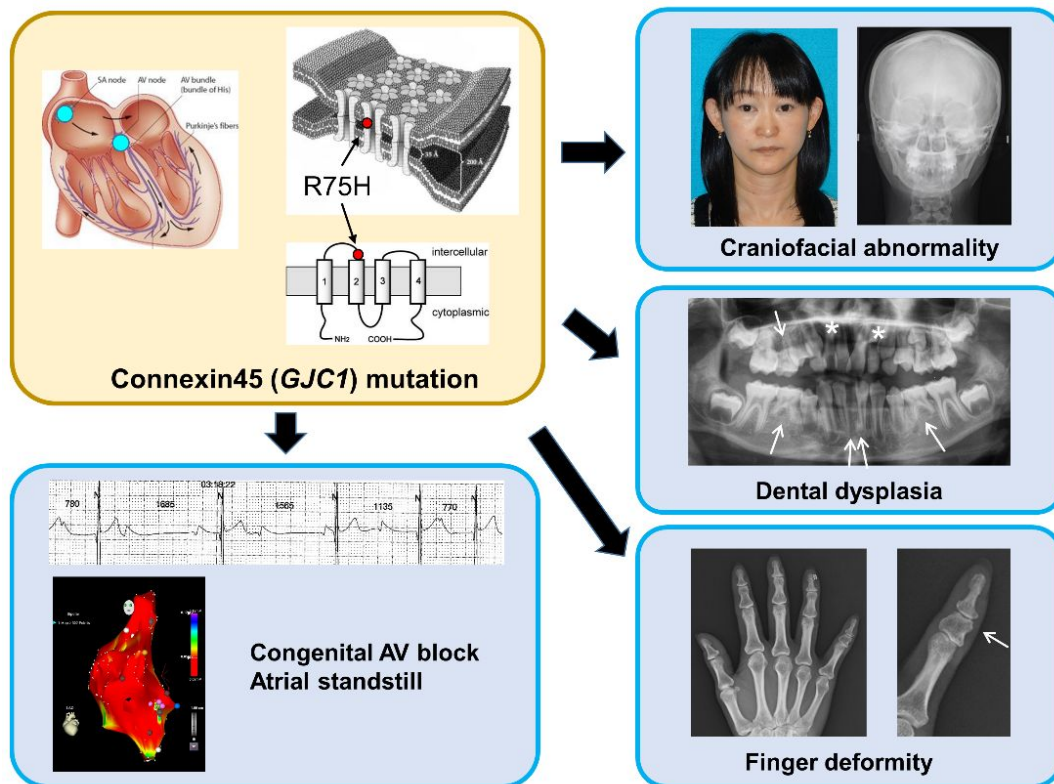


図. Cx45遺伝子変異による頭蓋骨・歯・手指骨形成異常を伴う新規進行性心房伝導障害