

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：家族性心臓伝導障害(CCD)は刺激伝導系の遺伝的な異常によってもたらされる遺伝性不整脈である。これまで心筋イオンチャネルなどいくつかの原因遺伝子が報告されているが、原因が未解明の症例も少なくない。本研究は、次世代シーケンサーを用いて 1) 家族性洞不全症候群、2) 進行性心臓伝導障害(PCCD)、3) 歯骨形成異常と房室結節・心房に限局した伝導障害を特徴とする新規 CCD で網羅的遺伝子解析を行い、新規疾患遺伝子を探索した。その結果、家族性洞不全症候群では、ペースメーカーチャネル遺伝子 *HCN4* の変異キャリアは発症が早く、心房細動と左室緻密化障害を高率に合併することが判明した。また日本人 PCCD 大家系の解析から、拡張型心筋症の原因サルコメア遺伝子タイチン(*TTN*)が PCCD の新規疾患遺伝子であることを同定した。さらに、歯骨形成異常と房室結節・心房に限局した伝導障害を特徴とする新規 CCD の原因遺伝子として、洞結節・房室結節に発現するギャップ結合コネクシン 45 の遺伝子 *GJC1* を同定した。心臓特異的 *Gjc1* ヘテロノックアウトは患者と同様に心房不整脈を示し、新規 CCD 症候群の原因遺伝子であることが証明された。本研究では家族性 CCD の新たな原因遺伝子と分子病態を解明することができた。

A．研究目的

心臓伝導障害(CCD)は心筋活動電位の形成・伝播に障害を有する除脈性不整脈の総称である。加齢や手術後や薬剤などによる二次的なものが多いが、家族内発症を示す遺伝性 CCD もみられる。遺伝性 CCD の中には、洞結節・心房・房室結節・His 束・左脚右脚・プルキンエ線維という一連の刺激伝導系のなかで伝播障害部位が限局しているものもあるが、進行性に拡大するものもある。遺伝性 CCD の原因遺伝子として、これまで心筋チャネル(*SCN5A*, *HCN4*, *TRPM4*)や核膜タンパク(*LMNA*)、膜アダプタータンパク(*ANK2*)、ギャップ結合(*GJA5*)などの変異の報告がある。遺伝性 CCD の中には正常 QRS 幅の房室ブロックを特徴とする進行性心房伝導障害もみられるが、その原因遺伝子は解明されていない。骨格筋ミオパチーなど心臓外の異常を伴う症候性 CCD は少ない。本研究の目的は、原因遺伝子が不明の家族性 CCD の新規原因遺伝子を解明し、その機能異常を解

明することである。

B．研究方法

1. 家族性洞不全症候群(SSS)の遺伝子解析

日本人家族性 SSS 38 家系に対し、PCR ダイレクトシーケンス法で SSS 関連遺伝子(*SCN5A*, *HCN4*, *LMNA*)の遺伝子解析を行った。新規 *HCN4*, *SCN5A* 変異は、ヒト cDNA プラスミドに遺伝子変異を導入し tsA201 細胞に発現させ、全細胞パッチクランプで、ペースメーカー電流(Ih)と Na 電流(INa)を測定した。本研究で同定した変異を含め、*HCN4* 変異陽性発端者 16 人、*SCN5A* 変異陽性発端者 32 人、非家族性 SSS 538 人の臨床情報をメタ解析した。

2. 進行性心臓伝導障害(PCCD)の日本人大家系に対する網羅的遺伝子解析

罹患者 17 人、非罹患者 9 人の 5 世代にわたる日本人 PCCD 大家系の病因を解明するために、ゲノムワイド SNP 解析・アレイ CGH・全エクソン解析で候補遺伝子を同定した。

さらにその近傍のゲノム領域 25M bp をキャ

ブチャーして病因と考えられるスプライシング変異を特定し、この変異による転写産物の異常をミニジーン法で確認した。

3. 家族性心房伝導障害の新規疾患遺伝子と病態の解明

31 家系の日本人家族性 SSS と房室ブロック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行い、15 家系のヨーロッパの孤発性房室ブロックについてトリオ全エクソン解析を行った。日仏 2 家系に共通して得られたギャップ結合変異の機能は、変異 cDNA プラスミドを N2a 細胞にトランスフェクションし、ギャップ結合でペアになった細胞の細胞間コンダクタンスをダブル whole-cell パッチクランプ法で測定し、さらに微小注入した蛍光色素の細胞間移動速度で評価した。

さらに Tamoxifen 誘導心臓特異的のノックアウトマウスを作成し、心臓カテーテルで洞結節・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. 研究結果

1. 家族性洞不全症候群(SSS)の遺伝子解析

家族性 SSS 38 家系中 2 家系に *HCN4* 変異を、3 家系に *SCN5A* 変異を同定した。tsA-201 細胞に発現させた新規 *HCN4* 変異 R393H はドミナントネガティブな抑制効果を示した。*SCN5A* の 3 変異も機能低下を示した。

またメタ解析から、*HCN4* 変異陽性の家族性 SSS 患者は、心房細動と左室緻密化障害を高率に合併し、思春期以降発症するという特徴を持つことが明らかになった。

2. PCCD の新規遺伝子解明

アレイ CGH では遺伝子の重複・欠損はなく、疾患関連領域はゲノムワイド SNP タイピングで染色体 2q のゲノム領域 25Mb に特定した。罹患者 3 人・非罹患者 1 人の全エクソン解析から、巨大サルコメア遺伝子タイチン(*TTN*) の新規スプライシング変異が同定され、家族 16 人で遺伝子型と心電図異常の完全な一致が確認された。さらに罹患者 4 人で染色体 2q のゲノム領域 25Mb をシーケンスし、4 人に共通するバリエーションを探索したところ 1,887 個確認されたが、理研の日本人全ゲノムデータベース(BBJ-WGS_1K)で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、*TTN* のスプライシング変異であることが確認された。この変異の機能異常を確認するために *TTN* のエクソン 260-263 のミニジーン実験を行ったところ、途中で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。

さらに *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、先のスプライシング変異と同様に短縮型の変異タンパクをきたすことが判明した。以上から、*TTN* は拡張型心筋症のみならず、PCCD の原因遺伝子であることが明らかになった。

3. 家族性心房伝導障害の新規疾患遺伝子と病態の解明

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キシン 45 (*Cx45*) 遺伝子 *GJCI* 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 はヘミチャンネルやギャップ結合ブラン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

家族性 SSS では、*HCN4* 変異キャリアは発症が早く、心房細動と左室緻密化障害を高率に合併することが判明した。また日本人 PCCD 大家系の解析から、拡張型心筋症の原因遺伝子 *TTN* が PCCD の新規疾患遺伝子であることを同定した。さらに、歯骨形成異常と房室結節・心房に限局した伝導障害を特徴とする新規 CCD の原因遺伝子として、洞結節・房室結節に発現するギャップ結合コネクシン 45 の遺伝子 *GJC1* を同定した。

E. 結論

家族性 SSS の遺伝子解析・メタ解析から、臨床病態の特徴は原因遺伝子によって異なることが明らかになった。PCCD・歯骨形成異常を伴う心房性 CCD にそれぞれ *TTN*, *GJC1* という新規疾患遺伝子が明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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 iPSC cell model of long-QT syndrome with a *CALM2*

mutation. *Hum Mol Genet* 26(9):1670-1677, 2017.

2. 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 electrocardiographic characteristics of probands with Brugada syndrome: A Japanese multicenter registry. *Circulation* 135(23):2255-2270, 2017.
3. 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.
4. 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* 14(5):717-724, 2017.
5. 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. 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

a 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.
4. Makita N. Genetic Background of Inherited Bradyarrhythmia. Korean Heart Rhythm Society 8th Annual Scientific Session, 2016/07/08, KINTEX, Korea.
5. Makita N. Overview of Genes Related to Cardiac Conduction. Korean Heart Rhythm Society 8th Annual Scientific Session, 2016/07/08, KINTEX, Korea.
6. Makita N. SCN5A and ventricular arrhythmias. Asian Pacific Heart Rhythm Society, 2015/11/22, Melbourne, Australia.
7. Makita N. New genes for Progressive Cardiac Conduction Disease. Heart Rhythm Society, 2015/05/14, Boston, USA.

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