

平成 30 年 6 月 9 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08867

研究課題名(和文) 次世代シーケンサーを用いた心臓突然死症例の網羅的遺伝子解析

研究課題名(英文) Comprehensive genetic analysis of sudden unexplained death syndrome cases using a next-generation sequencing

研究代表者

畑 由紀子 (Hata, Yukiko)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・准教授

研究者番号：30311674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： 私たちのグループは、原因不明の突然死(SUDS)症例の死因究明及び病態解明を目指して研究を行っている。これまでのSUDS症例の遺伝子解析は、主にチャネル遺伝子をターゲットとして行われていた。

私たちは連続剖検例についてSUDS症例を抽出し、病理組織学的検索及び遺伝子解析を行った。その成果の一つとして、従来から言われていたチャネル関連遺伝子に加えて心筋症関連遺伝子の関与について示し、心臓の病理学的評価と心疾患関連遺伝子の網羅的解析の両方を行う必要性を示した。

私たちの取り組みは、死因究明のみならず、突然死の予防に繋がると考えている。

研究成果の概要(英文)： The purpose of our study is to explore the cause and manner of sudden unexplained death syndrome (SUDS). Recent studies on the genetic analysis of SUDS cases have targeted the major channelopathy-associated genes.

We selected the SUDS cases in a series of autopsy cases of Japanese subjects and performed the pathological examination and gene analysis. As a result, we showed that hereditary heart diseases other than channelopathy may also be a significant cause of SUDS. In addition, a combined pathological and genetic evaluation may provide a reliable diagnosis of hereditary heart disease for SUD cases.

We believe that our studies will lead to not only the evaluation of the cause of death but the prevention of SUDS.

研究分野：法医学

キーワード：Sudden unexplained death Autopsy Cardiomyopathy Channelopathy Next-generation sequence E pilepsy

1. 研究開始当初の背景

我が国の突然死の発症数は5万人/年と推定される。法医学領域においては死因の究明は重要な課題である。解剖所見及び病理組織学的検査による診断、薬物スクリーニング、生前の病歴、死亡時の状況調査を考慮した結果、原因不明のSCDと診断せざるを得ない症例も少なからず存在する。

チャンネル異常症は、主に心臓のリズムと心臓の電気伝導に影響を与え、QT延長症候群(LQT)、カテコールアミン多型性心室頻拍(CPVT)、ブルガダ症候群、QT短縮症候群(SQT)、家族性心房細動(AF)グループからなる[Circulation 2012;125:2027-2034]。これらの遺伝子には、主にチャンネルタンパク質またはサブユニット、少数ではあるがイオンチャンネルのプロセッシングや輸送、あるいは細胞膜に関わるタンパク質も含まれる。欧米では心臓突然死の15-20%は、主に6つのイオンチャンネル遺伝子(KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNE2, RYR2)の疾患原因となる変異体をもつことが報告されている[Heart Rhythm 2011;8:1308-1339, Mayo Clin Proc 2012;87:524-539]。心筋症は、心筋そのものの異常(心筋の異常を引き起こす冠状動脈疾患、高血圧、弁膜症、先天性心疾患および他の二次的原因を伴わない)で、主に肥大型心筋症(HCM)、不整脈原性右室心筋症(ARVC)、特発性拡張型心筋症(DCM)、左室心筋緻密化障害(LVNC)グループからなる[N Engl J Med 2011;364:1643-1656]。HCM遺伝子はサルコメア、ARVC遺伝子はデスモゾームを構成するタンパク質、これに対しDCM遺伝子はZ帯、核ラミナ、中間フィラメントを含む多様な経路となっている。HCM患者のおよそ1%、ARVC患者の半数が突然死すると報告されている。HCM、DCM及びLVNCの分子基盤には、明確な境界はなくHCMに関連するMYBPC3、MYH7、TNNT2、ACTC1などはDCM、LVNCにも関連する[Heart Rhythm 2011;8:1308-1339]。2006年のAHAの提唱では、遺伝要素が強い心筋症のカテゴリーに、LQTやCPVTなどのチャンネル異常症が同時に分類され、心筋症と不整脈は分離して考えることのできない「final common pathway」上にあることが提唱された。

これまでSCD 38症例について、チャンネル異常症の主な遺伝子(KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNE2, CAV3, SCN4B)及び心筋症の主な遺伝子(サルコメア遺伝子MYH7, MYBPC3, TNNT2, TPM1, ACTC1, TNNI3)についてdirect sequence法を用いて遺伝子解析を行った。その結果、4症例に新規アミノ酸変異、12症例にはarrhythmia susceptibility SNPsを認め、症例のおよそ1/3に主なチャンネル異常症の遺伝子変異あるいはarrhythmia susceptibility SNPが潜在していること及び複数の遺伝子異常の関与について報告した[ISLM, 2014, Hata et al]。また、新規アミノ酸変異KCNH2\_G487R及びKCNH2\_M579fs+75Xについてはパッチクランプ法による機能解

析及び変異タンパク質の生化学的解析を行い傷害性について報告した。一方でサルコメア遺伝子の変異体は見つかっていない。現時点ではSCD症例の残り2/3は、原因不明である。検索していないチャンネル異常症や心筋症の遺伝子(direct sequence法では遺伝子解析が困難であった大きなタンパク質の遺伝子(RYR2, ANK2など)やサルコメア以外のデスモゾーム、Z帯、核ラミナ、中間フィラメントなど構造タンパク質の遺伝子)の関与と同時に複数の遺伝子の相互作用がSCD発症をもたらす可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

心臓突然死(SCD)の病因は、冠状動脈硬化症による虚血性心疾患の頻度が高いが、原因不明のSCDの病因は多様で必ずしも冠状動脈硬化症に限定されない。法医学例のなかには(特に若年例において)、病理検査においても致死的な病変が認められず原因不明のSCD疑いとされる症例も少なくない。一方、分子遺伝学や分子生物学による病因・病態の解明や分子検査技術の進歩によりSCDに寄与する遺伝性心疾患の理解の幅と深さが最近10年で飛躍的に進歩し、チャンネル異常症や心筋症などの遺伝性心疾患がSCDのリスクとして重要な役割を果たすことが知られるようになった。本研究の目的は、臨床に関連するチャンネル異常症や心筋症の原因遺伝子に着目し、SCDの分子基盤を解明することである。

3. 研究の方法

法医学例におけるSCD症例について、次世代シーケンサーを用いて表1に示す約70遺伝子すべてのエクソン部の遺伝子解析を行う。

表1 心疾患関連遺伝子

Disease	Gene	Arrhythmia mechanism	Function	Testing sensitivity and limitation	
channelopathy	LQTS	KCNQ1, KCNH2, SCN5A, ANK2, KCNE1, KCNE2, KCNJ2, CACNA1C, CAV3, SCN4B, AKAP5, SNTA1	Action potential prolongation; EADs	Cardiac ion channels (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> ) or regulatory proteins	Approximately 75% of LQT patients are positive; 5% patients have large deletions / duplications (indelet)
	BrS	SCN5A, GPD1L, CACNA1C, CACNA2B, SCN1B, KCNE3, SCN8B, ABCG9	Slow conduction in RV; loss of action potential dome in epicardial cells	Cardiac ion channels (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> ) or regulatory proteins	Approximately 25%-40% of Brugada patients are positive
CPVT	RYR2		Ca <sup>2+</sup> -mediated automaticity; premature calcium release from sarcoplasmic reticulum	Cardiac ion channels (Ca <sup>2+</sup> , K <sup>+</sup> ) or regulatory protein	Approximately 50%-70% of CPVT patients are positive
	SQTs	KCNQ1, KCNH2, KCNJ2, CACNA1C, CACNB2	Short AP; reentry and ventricular fibrillation	Cardiac potassium channels	Approximately 15%-20% of SQT patients are positive
AF	ABCG9, GATA4, HCN4, KCNE1, KCNE2, KCNE3, KCND1, KCNH2, KCNJ2, LMNA, MYOZ2, RYR2, SCN1B, SCN3B, SCN4B, SCN5A		unknown	Cardiac ion channels (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> ) or regulatory proteins	Unknown
	DCM	MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3, TNNI3, ACTC1, TPM1, MYL2, MYL2, ACTN2, GLA, KRAS, LAMP2, LDB3, MYH6, MYOZ2, PITRN1, PRR42Z, PLN, SPO1, TAZ, VCL	Sarcomeric protein dysfunction; myofibrillar disarray; re-entrant VT; EAD, DAD	Components of sarcomere, e.g., myosin heavy and light chains	Approximately 50%-60% of HCM patients are positive
ARVC	PKP2, DSP, DSP, DSP2, DSP2, RYR2, TMEM43	Re-entrant and DAD-mediated automaticity	Components of Desmosome, Ca <sup>2+</sup> regulation, and transforming growth factor	Approximately 50%-60% of ARVC patients are positive	
DCM	ABCG9, ACTG1, BAG3, DMD, EMD, DES, MYBPC3, ACTN2, PLN, LAMP2, LBD3, LMNA, MYH6, MYH7, SPO1, SCN5A, TAZ, TNNI3, TNNI3, TNNT2, TPM1, RAI1, VCL	Sarcomeric protein dysfunction; myofibrillar disarray; re-entrant VT; EAD, DAD	Components of sarcomere, Z-disk, nuclear lamina proteins, and intermediate filaments; RNA-binding proteins; molecular chaperone regulatory proteins	Approximately 25% of DCM patients are positive	
LVNC	ACTG1, LDB3, LMNA, MYBPC3, MYH7, TAZ, TNNT2, TPM1	unknown	Components of sarcomere and nuclear lamina proteins	Approximately 25% of LVNC patients are positive	

LQTS, long QT syndrome; BrS, Brugada syndrome; CPVT, Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia; SQTs, short QT syndrome; AF, atrial fibrillation; HCM, hypertrophic cardiomyopathy; ARVC, arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy; DCM, dilated cardiomyopathy; LVNC, left ventricular noncompaction cardiomyopathy; AP, action potential; DAD, delayed afterdepolarization; EAD, early afterdepolarization; LV, left ventricle; RV, right ventricle; VT, ventricular tachycardia.

具体的には、

(1) 法医学例からSCD症例の抽出(担当; 西田, 畑)

剖検執刀医西田のもと、死亡時の状況、解剖及び解剖後の検査(薬物・アルコールなど)から心臓突然死と診断された症例を抽出する。

(2) 心臓の肉眼所見及び病理組織学的所見

のまとめ(担当;西田,畑)

病理組織検体は、図1に示す乳頭筋レベルの左右心室横断面すべて及び洞房結節や房室結節-His束など刺激伝導系の標本作製する。冠状動脈に関しては、心外膜下冠状動脈の剖出及び横断切片の標本作製を行う。以上の標本すべてから病理組織学的所見をまとめる。

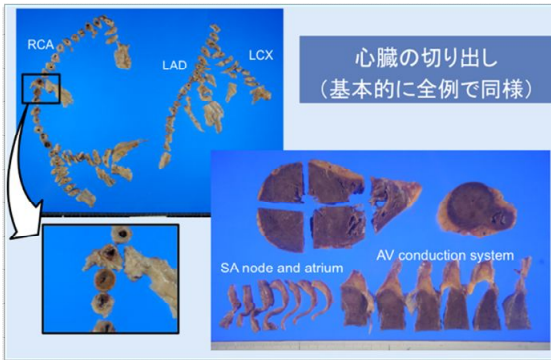


図1 心臓の切り出し部位

(3) 次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析(担当;畑)

SCD症例の血液からDNAを抽出し、チャンネル異常症や心筋症に關与する遺伝子など約70遺伝子のエクソン部位をターゲットにしたカスタムAmpliSeq™プライマーを用いて、次世代シーケンサー解析を行う。得られたデータについて、アミノ酸置換を伴う変異体をコンピューター解析により絞り込む(図2)。

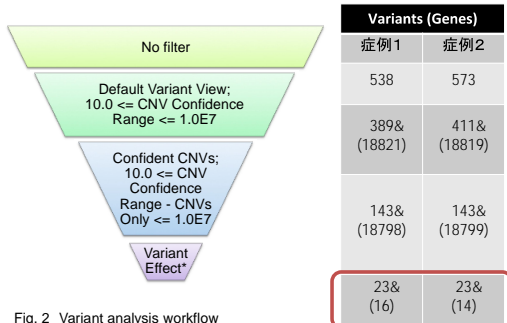


Fig. 2 Variant analysis workflow

\* stoploss, nonsense, missense, frameshiftInsertion, frameshiftDeletion, nonframeshiftBlockSubstitution, nonframeshiftInsertion, unknown, frameshiftBlockSubstitution, nonframeshiftDeletion

図2 変異体の絞り込み方法

(4) 変異体の傷害性に関するコンピューター解析(担当;畑)

絞り込まれた変異体について、新規/既知をdbSNP及び変異体特異的データベース検索を行い確認する。変異体の傷害性をSHIFT, PolyPhen2などの解析ツールを用いて予測する。

(5) Direct sequence法を用いた変異体確認(担当;畑)

新規及び傷害性を持つ変異体については、血液から抽出したDNA及び心臓パラフィン包埋切片から抽出したDNAを用いてシーケンサーで確認する。

(6) 新規K+, Na+チャンネル変異に対する機能解析(担当;木下,森,畑)

新規変異体について、組み換えDNA手法を用いて変異タンパク発現ベクターを作製する。正常のKCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNE2発現ベクターは作製済みである。

変異蛋白の生化学的解析

)正常あるいは変異発現ベクターをHEK293T培養細胞にトランスフェクションする。 )細胞抽出を作製し、ウェスタンブロットを行いタンパクの発現の有無を確認する。 )発現のlocalizationをconfocal顕微鏡で確認する。

変異イオンチャンネルの機能解析

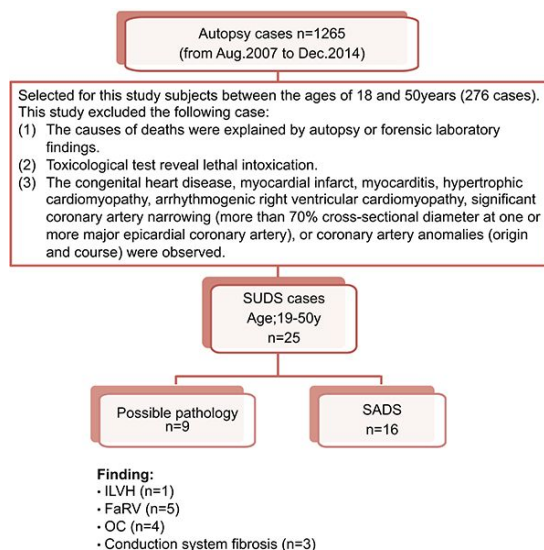
)作製した変異タンパク発現ベクター及び正常タンパク発現ベクターをHEK293T細胞にトランスフェクションする。 )HEK293T細胞の膜電流をwhole-cellパッチクランプ法を用いて、固定電位を様々に変化させて流れる電流を測定する。

#### 4. 研究成果

(1) 稀な小児発症バニッシング白質脳症の突然死剖検例において、脳の病理組織学的検索に加え、本症例が持つ遺伝子異常に關連する心臓突然死の原因になり得る所見について報告した(Int J Clin Exp Pathol 2014)。

(2) 冠状動脈奇形を有する剖検例の詳細な病理組織学的検索により、冠状動脈奇形が虚血性変化あるいは突然死の誘発因子となりうる可能性を示した(Cardiovasc Pathol 2015)。

(3) 2007年から2014年の連続法医剖検例1,265症例について、SUDSの基準を満たす症例を抽出し(19~50才)、病理組織学的検索及び心疾患關連遺伝子の網羅的解析を施行筋症や心臓発生に關与する転写因子の遺伝子変異を認めた。各種診断基準を満たさない軽微な病理組織学的異常所見を併せ持つ症例を示し、SUDS症例において早期心筋症の關与を示した(Heart Rhythm 2016)。



ILVH, Idiopathic left ventricular hypertrophy; FaRV, fatty replacement of right ventricle; OC, obesity cardiomyopathy

図3 病理学的所見によるSUDS症例のクラス分け

(4)てんかん関連急死剖検症例 (SUDEP) を対象とした検索結果では、チャンネル遺伝子変異の他、心筋症関連遺伝子変異を認めた。軽微な病理組織学的所見を併せ持つ症例を示し、病理所見と遺伝子型の一致を示唆した。SUDEP の一部に心臓由来の不整脈器質を有する症例が一定の割合で存在し、てんかん発作を契機に急死する可能性を示唆した (Brain Pathol 2017)。

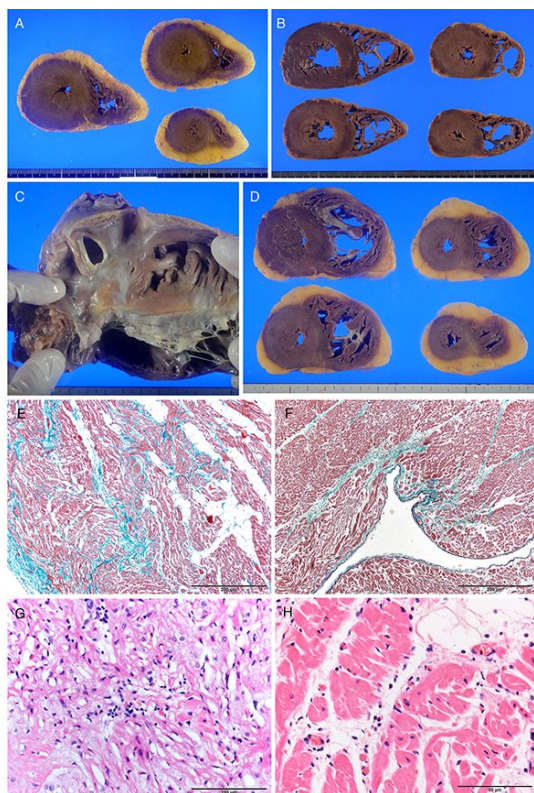


図4 SUDEP 症例の心臓

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 22 件)

Hata Y, Yoshida K, Kinoshita K, Nishida N. Epilepsy-related sudden unexpected death: targeted molecular analysis of inherited heart disease genes using next-generation DNA sequencing. *Brain Pathol*. 査読有り . 2017,27,292-304. DOI:10.1111/bpa.12390

Yamaguchi Y, Mizumaki K, Hata Y, Sakamoto T, Nakatani Y, Kataoka N, Ichida F, Inoue H, Nishida N. Latent pathogenicity of the G38S polymorphism of KCNE1 K<sup>+</sup> channel modulator. *Heart Vessels*. 査読有り . 2017,32,186-92. DOI: 10.1007/s00380-016-0859-1

Wang C, Hata Y, Hirono K, Takasaki A, Ozawa S, Nakaoka H, Saito K, Miyao N, Okabe M, Ibuki K, Nishida N, Origasa H, Yu X, Bowles NE, Ichida F. A wide and specific spectrum of genetic variants and

genotype-phenotype correlations revealed by next-generation sequencing in patients with left ventricular noncompaction. *J Am Heart Assoc*. 査読有り . 2017,6(9). DOI: 10.1161/JAHA.117.005918

Hata Y, Kinoshita K, Nishida N. An autopsy case with sudden unexpected death of young adult in hot baths: molecular analysis using next-generation DNA sequencing. *Clin Med Insights Case Rep*. 査読有り . 2017,10,1-6. DOI: 10.1177/1179547617702884

Nishida N, Hata Y. A case of sudden unexpected death with the presence of multiple myocardial bridges. *Int J Clin Cardiol*. 査読有り . 2017,4,099. DOI: 10.23937/2378-2951/1410099

Kinoshita K, Takahashi H, Hata Y, Nishide K, Kato M, Fujita H, Yoshida S, Murai K, Mizumaki K, Nishida K, Yamaguchi Y, Kano M, Tabata T, Nishida N. SCN5A(K817E), a novel Brugada syndrome-associated mutation that alters the activation gating of NaV1.5 channel. *Heart Rhythm*. 査読有り . 2016,13,1113-20. DOI: 10.1016/j.hrthm.2016.01.008

Hata Y, Kinoshita K, Mizumaki K, Yamaguchi Y, Hirono K, Ichida F, Takasaki A, Mori H, Nishida N. Postmortem genetic analysis of sudden unexplained death syndrome under 50 years of age: A next-generation sequencing study. *Heart Rhythm*. 査読有り . 2016,13,1544-51. DOI: 10.1016/j.hrthm.2016.03.038

Yamaguchi Y, Mizumaki K, Hata Y, Inoue H. Abnormal repolarization dynamics in a patient with KCNE1(G38S) who presented with torsades de pointes. *J Electrocardiol*. 査読有り . 2016,49,94-8.

Hata Y, Kinoshita K, Kudo K, Ikeda N, Nishida N. Anomalous origin of the right coronary artery from the left coronary sinus with an intramural course: comparison between sudden-death and non-sudden-death cases. *Cardiovasc Pathol*. 査読有り . 2015,24,154-9. DOI: 10.1016/j.carpath.2014.11.004

Hata Y, Chiba T, Ohtani M, Ishizawa S, Nishida N. An autopsy case of pneumococcal Waterhouse - Friderichsen syndrome with possible functional asplenia/hyposplenia. *Int J Clin Exp Pathol*. 査読有り . 2015,8,7518-25.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4525997/>

[学会発表](計 55 件)

畑由紀子, 木下耕史, 西田尚樹. Postmortem genetic analysis for sudden unexpected death -the current status and

future perspectives-. 第 81 回日本循環器学会学術集会; 2017.(シンポジウム)

畑由紀子, 西田尚樹. 次世代シーケンサーを用いた心臓突然死症例の遺伝子解析. NGS 現場の会・第 5 回研究会; 2017.

畑由紀子, 西田尚樹. 心臓突然死症例の molecular autopsy. 第 101 次日本法医学会学術全国集会; 2017.(シンポジウム)

Hata Y, Kinoshita K, Mizumaki K, Yamaguchi Y, Hirono K, Ichida F, Nishida N. Sudden unexpected death of the people under 50-years-old in Japanese hot baths: molecular analysis using next-generation DNA sequencing. 第 80 回日本循環器学会学術集会; 2016.

畑由紀子, 木下耕史, 西田尚樹. 遺伝子解析で診断した特発性心筋症の早期像を呈していると考えられた 2 剖検例. 第 105 回日本病理学会総会; 2016.

Hata Y, Kinoshita K, Mizumaki K, Yamaguchi Y, Misaki T, Nishida N. Postmortem genetic analysis of sudden unexplained death syndrome under 50 years of age: a next-generation sequencing study. 第 63 回日本不整脈心電学会学術大会; 2016.

Hata Y, Kinoshita K, Ichida F, Hirono K, Mori H, Nishida N. Targeted Next-generation Sequencing for Postmortem Molecular Analysis of Sudden Cardiac Death. 第 79 回日本循環器学会学術集会; 2015.

畑由紀子, 木下耕史, 西田尚樹. 入浴中の急死例における次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析. 第 99 次日本法医学会学術全国集会; 2015.

畑由紀子, 水牧功一, 城宝秀司, 市田路子, 西田尚樹. ジストロフィン (DMD) 遺伝子のミスセンス変異を認めた若年性心臓突然死症例. 第 63 回日本心臓病学会学術集会; 2015.

畑由紀子, 木下耕史, 西田尚樹. 心臓特異的転写因子 TBX5 に遺伝子変異を認めた心臓突然死の 2 剖検例. 第 37 回日本法医学会学術中部地方集会; 2015.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/legal/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

畑 由紀子 (HATA Yukiko)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・  
准教授

研究者番号: 30311674

### (2) 研究分担者

森 寿 (MORI Hisashi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・  
教授

研究者番号: 00239617

木下 耕史 (KINOSHITA Koshi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・  
助教

研究者番号: 10585920

西田 尚樹 (NISHIDA Naoki)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・  
教授

研究者番号: 10315088