

平成30年6月19日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09680

研究課題名(和文) 早期に発症する遺伝性不整脈の遺伝子型と臨床的表現型の関連の検討及び治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of treatment strategies for early-onset inherited arrhythmias based on genotype-phenotype relationships

研究代表者

堀米 仁志 (HORIGOME, Hitoshi)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：50241823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：先天性QT延長症候群(LQTS)の乳児突然死症候群(SIDS)への関与を検討するため、両者から検出されるLQT2とLQT3の遺伝子変異部位を比較した。両者間の重複はLQT2では全くなく、LQT3でも少なかった。その原因として両者の好発時期が異なること、症例数が少ないこと、環境など他因子の関与などが推定された。

高精度心電図に独立成分分析(ICA)、主成分分析(PCA)を適用し、LQTSの再分極過程を評価した。T波を構成する独立成分は健常者で4個、LQTSでは全例が5～7個で、PCA-ratioもLQTSで高値を示した。本法はLQTSの再分極不均一性の検出に有用と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Congenital long QT syndrome (LQTS) is considered to be implicated in the development of sudden infant death syndrome (SIDS). Mutation sites of early-onset LQTS (type 2 and 3) were compared with those detected in SIDS victims. The locations were completely different between the two groups for LQT2, and only four mutations overlapped each other for LQT3. These dissociations might be due to difference in vulnerable age, small number of subjects of the study, and that environmental or other factors are required for development of SIDS.

T waves in patients with LQTS were evaluated by independent component analysis (ICA) and principle component analysis (PCA) of the data obtained by high-frequency ECG. The number of independent component was 4 in control subjects while 5-7 in LQTS patients. PCA ratios were also significantly higher in LQTS. ICA/PCA might be useful for detection of heterogeneity of repolarization in LQTS.

研究分野：小児循環器病学

キーワード：遺伝性不整脈 先天性QT延長症候群 遺伝子型 心電図 独立成分分析 主成分分析

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝性不整脈は、心臓の興奮とその伝導を司るイオンチャネルやその調節蛋白をコードする遺伝子の異常が原因となって一次性に致死的な心室不整脈や徐脈を起こすものであり、心臓に構造異常がない状態で心臓性突然死を起こす疾患のなかではもっとも重要である。遺伝性不整脈はいずれの年齢層でも発症し、小児期の突然死の原因としても重要であるが、特に胎児・新生児期に発症する遺伝性不整脈は予後不良で、特殊な一群としてとらえるべきである。申請者らがわが国で初めて行った胎児・新生児期～乳児期 LQTS の全国調査 (Horigome, et al: Circ Arrhythm Electrophysiol, 2010) によれば、心室頻拍、torsade de pointes (Tdp)、房室ブロックを伴って発症し、重篤な臨床経過をたどる症例の多くは、LQTS 2 型 (KCNH2 変異)、LQTS 3 型 (SCN5A 変異)、および LQTS 8 型 (CACNA1C 変異) であった。一方で、わが国の乳児死因順位第 3~4 位を占める乳児突然死症候群 (sudden infant death syndrome, SIDS) や原因不明の胎児死亡の一部は、LQTS をはじめとする遺伝性不整脈が関連していることが相次いで報告されている (Arnestad, et al: Circulation 2007、Crotti L, et al: JAMA 2013)。特に LQTS 3 型は睡眠時や安静時に Tdp を起こしやすいため、睡眠中に発生しやすい SIDS と共通していて、両者の関連に興味もたれている。以上のことから、LQTS を代表とする遺伝性不整脈の早期診断法と治療法の確立は急務と考えられている。

(2) 遺伝性不整脈の代表である LQTS の T 波形は遺伝子型によってある程度特徴的な形態を呈し、遺伝子型の診断上有用であることが以前から報告されている。しかし、ほとんどが視覚的、定性的なものであった。定量的に T 波形態を解析できれば、遺伝子検査の結果を待たずに早期から治療介入できるばかりでなく、心室不整脈の発生や予後の予測につながる可能性がある。申請者らはデジタル心電図データに新しい多変量解析である独立成分分析を応用し、LQTS の診断精度の向上に有用であることを報告してきた。通常的心電図では QT 時間は心拍数、自律神経、薬剤などに影響されて変動し、QT 時間を正確に評価することは必ずしも容易でない。我々の開発した新しい T 波解析法はこの欠点を補い、ハイリスク例を検出できる可能性がある。早期発症 LQTS のみならず、他の遺伝性不整脈の診断精度を向上させることも期待される。たとえば、Andersen-Tawil 症候群 (ATS, LQTS7 型) の心電図は巨大な U 波に特徴があるが、その成因は明らかになっていない。また、カテコラミン誘発多形性心室頻拍 (CPVT) は安静時の心電図がほとんど正常であり、運動時や交感神経緊張時の二方向性心室頻拍または多源性心室頻拍が特徴である。上記の方法は、これらの疾患の波形解析、診断に応用で

きる可能性がある (Horigome, Ishikawa, et al: Circ Arrhythm Electrophysiol 2011; 堀米仁志, 他: 日本心臓病学会雑誌 2013; Ishikawa, Horigome, et al: Int J Wavelets Multiresolut Inf Process 2014)。

2. 研究の目的

(1) 胎児・新生児期、乳児期早期に TdP や(機能的)房室ブロック (atrioventricular block, AVB) を伴って発症する LQTS の SIDS への関与を検討するため、早期発症の重症型 LQTS (KCNH2 遺伝子) と LQTS (SCN5A 遺伝子) の変異部位を、SIDS の molecular autopsy で検出された同遺伝子変異と比較検討し、変異部位にどの程度のオーバーラップがあるか検討した。

(2) LQTS には QT 延長以外にもう一つの心電学的特徴として T 波の形態異常があり、遺伝子型の診断に有用な可能性がある。また、心室不整脈の発症には再分極過程の不均一性が関与するため、T 波形態の解析はハイリスク症例を見極めるのに有用な可能性がある。そこで、遺伝子検査で変異型が確定している LQTS 症例を対象として、新しい高精度デジタル心電図を記録し、再分極過程に多変量解析である独立成分分析 (independent component analysis, ICA) および主成分分析 (principal component analysis, PCA) を応用し、LQTS の診断およびその遺伝子型の診断における有用性を探った。

3. 研究の方法

(1) 早期発症 LQTS と SIDS 症例の LQTS 関連遺伝子変異部位の比較

全国調査で登録された胎児・新生児期～乳児期の LQTS2 型、LQTS3 型症例および文献上報告されている同遺伝子型の症例 (早期発症 LQTS 群) を対象として、その遺伝子変異の部位、診断時の QTc、AVB (機能的) と TdP/心室頻拍 (ventricular tachycardia, VT) の頻度を検討した。SIDS 症例から molecular autopsy によって検出された LQTS2 型、LQTS3 型関連の遺伝子変異については、日本では系統的、前向きな研究、調査が行われていないため、国内外を含め SIDS 症例から検出された文献上報告されている遺伝子変異を集計した (SIDS 群)。遺伝子変異部位について、早期発症 LQTS 群と SIDS 群間で比較検討した。

(2) ICA および PCA を用いた LQTS の T 波の解析

遺伝子検査で病的変異が検出された先天性 QT 延長症候群 (LQTS)、および健常者を対象として、下記の手順により再分極過程の解析を行った。

データ・サンプリング (心電図記録)

心電図記録には携帯型多用途生体アンブ (AP1532、TEAC 社製) を用いた。体表面電極には 11 個のアクティブ電極 (TEAC 社製 Au1)

を使用し、時定数 3.0 秒、1,024 Hz で 10 チャネルの時系列データとして収集した。チャンネル 1 は第 1 誘導、チャンネル 2 は第 2 誘導、チャンネル 3 は第 3 誘導、チャンネル 4-9 は胸部と左足間の双極誘導で、それぞれ通常の 12 誘導心電図の C1-C6 (たとえば C1 は第 2 肋間胸骨右縁・左足間の双極誘導) に相当する。チャンネル 10 は 4C9 で、第 4 肋間胸骨左縁とちょうどその背中側の位置との双極誘導とした。心電図記録はできるだけ電氣的ノイズが少ない脳波室などの検査室で行った。データは A/D コンバータ(Elmec 社製、EC-2360)を用いてデジタル化し、パーソナルコンピュータに保存した。C1-C6 のデータは以下の式により V1-V6 に変換した。

$$V_i = C_i + (I_1 + I_{II})/3 \quad (\text{ここで } i=1 \sim 6)$$

心電図データの解析

データ解析の概略は筆者らの論文 (Horigome H, Ishikawa Y, et al: Circ Arrhythm Electrophysiol 2011; 4: 456-464) に記載されている。

独立成分分析 (ICA) は、1) TU 波領域を対象としたウェーブレット変換によるノイズ処理、2) ランダムノイズ負荷法を用いた radical ICA、3) 繰り返し行った ICA の結果からベストモデルを選択する過程から成り立っている。

主成分分析 (PCA) は、高次元データが特定方向に広くばらつくことを利用して、1) TU 波領域を対象としてもっとも大きなばらつきを持つ方向：第 1 主成分と、第 1 主成分と直交し、次に大きなばらつきを持つ方向：第 2 主成分を求め、2) その比 (PCA ratio=PCA2/PCA1) を算出した。

また、LQTS 症例を ICA で得られた IC の数によって分け、LQTS 群 (LQT1~3) に正常対照群を加えた 4 群における PCA ratio の値を比較検討した。統計には R ソフトウェアを用い、前者には ANOVA と Bonferroni 法を用いた post hoc test を、後者には 二乗検定、Fisher の正確な確率および t 検定を適用した。P<0.05 を有意水準とした。

4. 研究成果

(1) 早期発症 LQTS と SIDS 症例の LQTS 関連遺伝子変異部位の比較

早期発症 LQTS 群：筆者らが行った全国調査で登録されたものが 82 例、文献上報告されたものが 38 例で合計 120 例であった。そのうち LQT2 が 35 例 (29%)、LQT3 が 39 例 (33%) であった。これらの症例の診断時期と家族歴を表 1 に、ECG 所見 (QTc および機能的 AVB、TdP/VT の頻度) を表 2 に示した。LQT2、LQT3 とともに著明な QT 延長を呈し、高率に重症不整脈を伴っていた。SIDS 群：文献上 molecular autopsy によって LQT2、LQT3 関連の遺伝子変異が検出されたと報告されている SIDS 症例は 50 例であった。

早期発症 LQTS 群と SIDS 群における LQT2 (KCNH2 遺伝子) の変異部位の比較では、

前者がほとんど例外なく pore 部位に位置したのに対して、SIDS 群では細胞内の N 末端、C 末端に分布し、両群間にオーバーラップはなかった。早期発症 LQT2 で多くの症例が集積した変異は T613M (9 例) と G628S (4 例) であった。

LQT3 (SCN5A 変異) では早期発症 LQTS 群では膜貫通部位と C 末端に多い傾向があったのに対して、SIDS 群ではチャンネル蛋白全体に広く分布していた。早期発症 LQT3 で多くの症例が集積した変異は R1623Q (11 例)、SIDS 群では F2004L が 3 例にみられた。両群間でオーバーラップが見られたのは、T1304M、R1623Q、V1951L、P2006A の 4 つのミスセンス変異が各 1 例であった。

表 1 早期発症 LQTS

遺伝子型	n	診断時期 胎児期 ・新生児期 ・それ以降	LQTS、 突然死の 家族歴 あり (%)
LQT2	35	10 例 ・ 24 例 ・ 1 例	50%
LQT3	39	17 例 ・ 17 例 ・ 5 例	30%

表 2 早期発症 LQTS の ECG 所見

遺伝子型	n	QTc (ms)	房室 ブロック	TdP
LQT2	35	585 ± 81 (480-840)	26/35 (74%)	24/35 (68.5%)
LQT3	39	616 ± 100 (446-860)	28/39 (72%)	26/39 (67%)

(2) ICA および PCA を用いた LQTS の T 波の解析

遺伝子検査で LQTS が確定した症例 43 例を対象とした。その内訳は、LQT1 (KCNQ1 遺伝子変異) 22 例、LQT2 (KCNH2 遺伝子変異) 7 例、LQT3 (SCN5A 遺伝子変異) 14 例であった。健常者 29 例を正常対照群とした。

< QTc 値 (s) > 健常群 0.40 ± 0.03、LQT1 0.51 ± 0.05、LQT2 0.53 ± 0.05、LQT3 0.49 ± 0.03 であった。

< ICA の結果 > 対照群は 29 例全例で T 波が 4 つの基本独立成分 (IC) から構成されていたのに対して、LQT1 は 5~6 個 (5 個が 14 例、6 個が 8 例)、LQT2 は 6~7 個 (6 個が 4 例、7 個が 3 例)、LQT3 は 6~7 個 (6 個が 5 例、7 個が 9 例) の IC が検出された。すなわち、LQTS ではタイプによらず 5 個以上の IC が検出され、過剰な 1 つ以上の IC があることになり、ICA の数によって健常者と判別できた。LQT1~LQT3 を IC 数で鑑別することはできない

かったが、LQT1 に比べて、LQT2, 3 では IC 数が多い傾向があった。しかし、有症状例の数が少なかったため症状(失神・心室頻拍)の有無による比較はできなかった。

< PCA の結果 > PCA-ratio (%) は健常群で 16.8 ± 8.5 、LQT1~3 ではいずれも健常群より有意に高値(LQT1 群 31.6 ± 21.3 、LQT2 群 41.3 ± 15.2 、LQT3 群 34.2 ± 21.5)を示した(表3)。Bonferroni post-hoc test では、対照群に比して、LQT1 ($p=0.015$)、LQT2 ($p=0.0053$)、LQT3 ($p=0.0125$) いずれも高値を示した。LQTS の各群間の比較では LQT2 が高値の傾向を示したものの有意差は認められなかった。

表3 各群の PCA-ratio

	平均	SD	最大値	最小値
健常者	0.168	0.085	0.383	0.035
LQT1	0.316	0.213	0.707	0.065
LQT2	0.413	0.152	0.675	0.224
LQT3	0.342	0.215	0.877	0.06
LQT7	0.251	0.126	0.512	0.097

(3) Andersen-Tawil 症候群 (ATS, LQTS7 型) の T 波の解析

ATS の 6 例ではいずれも大きな U 波は 2 つの IC から構成され、かつ、その 1 つ以上の IC は T 波を構成する成分ではなく、U 波だけを構成する IC であった。それに対して、LQT1 や健常例で見られる U 波は T 波構成成分の IC の一部であった。

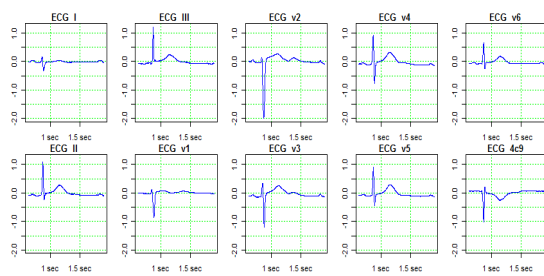


図1 32歳男性ATS1の体表面12誘導心電図
大きなU波が認められる。

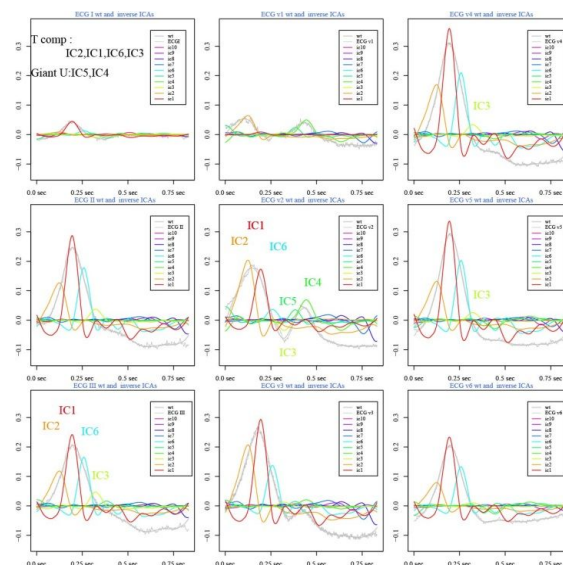


図2 標準体表面心電図(図1)を独立成分(IC)へ分解した結果、通常は4個の成分が6個検出された。そのうちIC5, IC4はU波を構成しT波の形成には寄与していない。T波はIC2, IC1, IC6, IC3で構成されている。PCA-ratioは15.8%。

(4) < IC 数と PCA ratio の関連 > PCA-ratio は IC 数と有意に相関し、両指標が再分極過程の不均一性を表わすことを示唆していた(図3)。

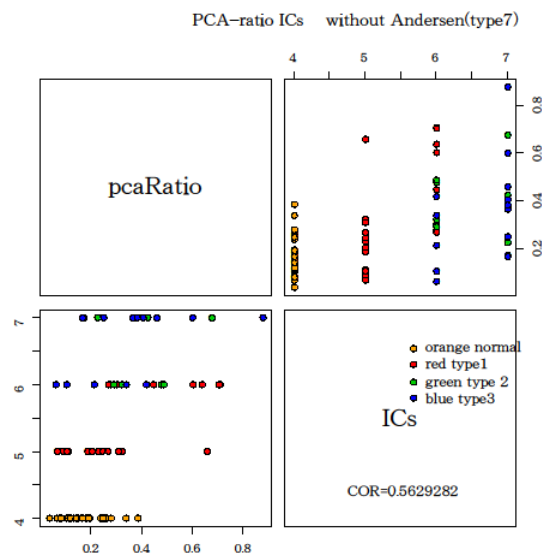


図3 独立成分の数と PCA-ratio の相関

< 考案 >

(1) 早期発症 LQTS と SIDS の変異部位を検討した結果では、SCN5A (LQT3) にみられたオーバーラップはわずかであった。早期発症 LQT3 の 1/3 の症例が集積した R1623Q 変異も SIDS では 1 例にみられたのみであった。また、KCNH2 (LQT2) 変異部位については、早期発症 LQT2 がほとんど例外なく変異は pore 部位にあったのに対して、SIDS ではそれ以外の場所

であり、オーバーラップはなかった。この理由の一つとして、早期発症 LQTS の発症時期は妊娠満期～新生児期（特に出生後数日以内）にピークがあるため、SIDS の好発時期（生後 2～4 か月）と異なり、別の集団を見ている可能性がある。今回の検討では対象数が少ないこと、人種による差が検討できていないことも影響した可能性がある。また、SIDS の発症には、1) critical developmental period, 2) extrinsic risk factors, 3) vulnerable infant (genetic predisposition) の 3 つのリスク因子が重なることが重要であるとする triple risk hypothesis がある。この説によれば、LQTS 関連の遺伝子変異が基礎にあり、環境因子が加わったときにはじめて SIDS を発症するため、変異遺伝子の存在のみでは SIDS を説明できない場合が多いことを示唆している。

(2) LQT1 型～3 型を対象とした ICA、PCA による T 波形の解析で、健常人全例で T 波は 4 つの基本独立成分 (IC) から構成されていたのに対して、LQT1～3 では全例で過剰な IC が検出され、5 個以上の IC から構成されていた。過剰な IC の存在による LQTS 診断の感度、特異度は極めて高いことになる。特に LQT1 の IC 数は 5 個か 6 個であったのに対して、LQT2, 3 では 6 個か 7 個の IC が検出され、心筋再分極過程の不均一性がより大きいことを示唆している。また、LQTS の T 波を PCA で分解した結果、第 3 主成分までで波形のほとんどが説明されたが、PCA ratio は健常者と比べて高値を示した。特に LQT2 の PCA ratio は他の LQT タイプよりも高値をとる傾向があり、PCA が LQT2 の診断に有用である可能性も示唆された。ICA と PCA の比較では、IC の個数が多いと PCA ratio も高値を示す傾向が見られた（図 3）。これは両者がともに心筋再分極過程の不均一性を示していることの裏付けとなる。LQTS に限らず再分極過程の不均一性は催不整脈性とも関連し、T 波の PCA ratio は心血管系死亡の予測に有用であることも報告されている。しかし、本研究では不整脈症例が少なく、不整脈発生リスクの検討はできなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 22 件)

堀米仁志、【適切な学校心臓検診 見逃してはいけないポイントと管理】不整脈、日本医事新報、査読無、4898 号、2018、24-31

<http://www.jmedj.co.jp/journal/paper/detail.php?id=9485>

堀米仁志、吉永正夫、乳児期発症先天性 QT 延長症候群 (LQTS) と乳児突然死症候群にみられる LQTS 関連遺伝子変異の比較、循環器専門医、査読無、26 巻、2018、64-69

<http://www.j-circ.or.jp/form/kankou>

butsu/kounyu.htm

Yoshinaga M, Iwamoto M, Horigome H, Sumitomo N, Ushinohama H, Izumida N, Tauchi N, Yoneyama T, Abe K, Nagashima M, Standard Values and Characteristics of Electrocardiographic Findings in Children and Adolescents, Circulation Journal, 査読有, vol.82, 2018, 831-839

DOI:10.1253/circj.CJ-17-0735

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, 査読有, vol.14, 2017, 717-724

DOI:10.1016/j.hrthm.2017.01.020

Hirabayashi M, Yoshinaga M, Nomura Y, Ushinohama H, Sato S, Tauchi N, Horigome H, Takahashi H, Sumitomo N, Shiraishi H, Nagashima M, Environmental risk factors for sudden infant death syndrome in Japan, European Journal of Pediatrics, 査読有, vol.175, 2016, 1921-1926

DOI:10.1007/s00431-016-2786-7

Sumitomo N, Horigome H, Miura M, Ono H, Ueda H, Takigiku K, Yoshimoto J, Ohashi N, Suzuki T, Sagawa K, Ushinohama H, Takahashi K, Miyazaki A, Sakaguchi H, Iwamoto M, Takamuro M, Tokunaga C, Nagano T; Heartful Investigators, Study design for control of HEART rate in inFant and child tachyarrhythmia with heart failure Using Landiolol (HEARTFUL): A prospective, multicenter, uncontrolled clinical trial, Journal of Cardiology, 査読有, vol.70, 2017, 232-237

DOI:10.1016/j.jjcc.2016.12.002

Horigome H, Dilated Cardiomyopathy in Children With Isolated Congenital Complete Atrioventricular Block, Circulation Journal, 査読無, vol.80, 2016, 1110-1112

DOI:10.1253/circj.CJ-16-0284

Ishizu T, Horigome H, Assessment and treatment of systemic right ventricular dyssynchrony, Circulation Journal, 査読有, 2015, vol.79, 519-521

DOI:10.1253/circj.CJ-15-0105

[学会発表](計 77 件)

Horigome H, Neonatal Arrhythmias: Beware the Channelopathy; Risks for Sudden Cardiac Death, the 7th World Congress of Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery (WCPCCS), Barcelona, Spain, 2017.7.17

堀米仁志、吉永正夫、住友直方、林立申、加藤愛章、牛ノ濱大也、田内宣生、大野聖子、清水 渉、堀江 稔、長嶋正實、シンポジウム 9 (A)心臓突然死の遺伝的背景「Genetic Background of Congenital Long QT Syndrome Diagnosed in Infancy and Comparison of Their Gene Mutations with Those in SIDS」、第 81 回日本循環器学会学術集会、金沢、2017.3.18

Nozaki Y, Kato Y, Lin L, Uike K, Yamamura K, Sekiguchi Y, Nogami A, Ohno S, Horie M, Shimizu W, Aonuma K, Horigome H, Six Patients with Ryanodine Receptor type2 Mutation Presenting with the Phenotype of both Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia and Left Ventricular Noncompaction, 第 63 回日本不整脈心電学会学術集会、札幌、2016.7.15

Horigome H, Yoshiaki Kato, Lisheng Lin, Takeshi Inaba, Miho Takahashi, Yoshihiro Nozaki, Akihiro Nakamura, Ryo Sumazaki, In utero diagnosis and treatment of long QT syndrome -Literature review with a special reference to the usefulness of MCG-, Asian Symposium on Magnetocardiography 2015, Daejeon, Korea, 2015.11.03

Yoshinaga M, Horigome H, Ushinohama H, Ohno S, QT intervals during sleeping and around wake-up periods in school-aged patients with long QT syndrome and age-matched healthy controls, 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合同学術大会、京都、2015.7.29

堀米仁志、高橋一浩、石川康宏、林立申、加藤愛章、中村昭宏、野崎良寛、高橋実穂、住友直方、岩本眞理、吉永正夫、主成分分析と独立成分分析を用いた先天性 QT 延長症候群の T 波の解析 - LQT1 と LQT3 における解析 -、第 51 回日本小児循環器学会総会・学術集会、東京、2015.7.17

Nozaki Y, Kato Y, Lin L, Nakamura A, Takahashi M, Sekiguchi Y, Nogami A, Aonuma K, Horigome H, Refractory tachyarrhythmias caused by ryanodine receptor type 2 gene mutation in two patients with left ventricular noncompaction, Heart Rhythm 2015,

Boston, USA, 2015.05.13

石川伸行、亀田有里、堀米仁志、加藤啓輔、中尾朋平、吉見 愛、村上 卓、塩野淳子、小池和俊、土田昌宏、化学療法後小児がん患者の心エコー・スペックルトラッキング法を用いた心機能評価、第 118 回日本小児科学会学術集会、大阪、2015.4.19

高尾 航、大原玲奈、眞弓みゆき、人見義郎、八木洋也、安部加奈子、永井優子、小島真奈、堀米仁志、濱田洋実、吉川裕之、洞性徐脈の評価に胎児心磁図が有用であった症例、第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会、横浜、2015.04.11

7. 研究組織

(1) 研究代表者

研究代表者

堀米 仁志 (Horigome, Hitoshi)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：50241823

(2) 研究協力者

堀江 稔 (HORIE, Minoru)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：90183938

林立申 (LIN, Lisheng)

茨城県立こども病院・小児循環器科・医長

亀田 有里 (KAMEDA, Yuri)