

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15311

研究課題名(和文) コラーゲン遺伝子異常による心臓刺激伝導障害の新たな分子病態の解明

研究課題名(英文) Novel molecular basis of cardiac conduction disturbance associated with a collagen gene mutation

研究代表者

蒔田 直昌 (MAKITA, Naomasa)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：00312356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：家族性心臓伝導障害家系の全エクソン解析で、VI型コラーゲン(COL6A2)を同定した。Purkinje線維周囲のコラーゲンが、隣接する心室筋細胞との絶縁効果を高め、迅速な心室内伝導をもたらす可能性を検証するために、COL6A2の心筋内・細胞内局在を分析した。胎生時にはCOL6A2は心室筋細胞の全層にわたって発現していたが、年齢依存性に心内膜側に集族するようになり、生後1月ではほぼ刺激伝導系に強く発現していた。一方、CRISPR/Cas9ゲノム編集で作成したCOL6A2変異ノックインマウスは、予想に反して、年齢12カ月でも心電図異常を示さなかった。

研究成果の概要(英文)：We found a mutation in type 6 collagen (COL6A2) in several families with progressive cardiac conduction defect. COL6A2 was evenly expressed in mouse ventricular wall during the embryonic stage, which became more restricted at the endocardial wall, age-dependently. At the age of one month, COL6A2 was observed nearly exclusively at the cardiac conduction system. Contrary to our expectation, COL6A2 mutation knock-in mice established by using CRISPR/Cas9 system showed no ECG abnormalities even 12 months after birth.

研究分野：循環器内科学

キーワード：コラーゲン 進行性心臓伝導障害 ノックインマウス CRISPR/Cas9

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は全エクソン解析を用いて、家族性心臓伝導障害の新規原因遺伝子として VI 型コラーゲン(COL6A2)を見出した。これまで細胞外マトリックスのコラーゲンと心臓電気現象の間に直接的な関連は知られていないが、末梢神経の軸索を覆い跳躍伝導をもたらすミエリン鞘と同様、Purkinje 線維周囲のコラーゲンが、隣接する心室筋細胞との絶縁効果を高め、迅速な心室内伝導をもたらす可能性がある。

### 2. 研究の目的

上記の仮説を検証するために、刺激伝導系を GFP 標識した *contanctin2* マウスを用いて COL6A2 の心筋内・細胞内局在を分析し、さらに COL6A2 変異ノックインマウスを作成し伝導障害を *in vivo* で評価する。また心房性心臓伝導障害家系の新規原因遺伝子を同定する。

### 3. 研究の方法

- (1). Purkinje 線維標識マウス心筋における COL6A2 の局在・経年変化を解析する。
- (2). CRISPR/Cas9 システムを用いて COL6A2 ノックインマウスを作成し、心電図で伝導障害の有無を調べる。
- (3). 心房性心臓伝導障害家系の新規原因遺伝子を次世代シーケンサーで解明する。

### 4. 研究成果

- (1). VI 型コラーゲンをマウス心臓で免疫組織染色した。胎生時には VI 型コラーゲンは心室筋細胞の全層にわたって発現していたが、年齢依存性に心内膜側に集積するようになり、生後 1 月ではほぼ刺激伝導系に強く発現していた。
- (2). COL6A2 変異 P402A ノックインマウスを作製した。年齢 12 カ月の F2 マウスで心電図計測したが、心拍数、PR 時間、QRS 幅、QTc 時間いずれも差がなかった。
- (3). 新規心房性伝導障害の網羅的遺伝子解析で、ギャップジャンクション遺伝子 *GJC1* (コネキシン 45) の変異を同定し、その結果を *in vitro*, *in vivo* 解析した。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 25 件、11 以外は査読あり)

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*. 2018;596:809-825.
2. Gray B, Hasdem C, Ingles J, Aiba T, Makita N, Probst V, Wilde A, Newbury-Ecob R, Sheppard M, Semsarian C, Sy R, Behr E. Lack of genotype-phenotype correlation in Brugada syndrome and sudden arrhythmic

death syndrome families with reported pathogenic SCN1B variants. *Heart Rhythm*. 2018;in Press.

3. 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*. 2017;26:1670-1677.
4. 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 Proband With Brugada Syndrome: A Japanese Multicenter Registry. *Circulation*. 2017;135:2255-2270.
5. Takahashi K, Ishikawa T, Makita N, Takefuta K, Nabeshima T, Nakayashiro M. A novel *de novo* calmodulin mutation in a 6-year-old boy who experienced an aborted cardiac arrest. *HeartRhythm Case Reports*. 2017;3:69-72.
6. 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 A, 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 system defects associated with bone malformation caused by a connexin45 mutation. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70:58-70.
7. Oshima Y, Yamamoto T, Ishikawa T, Mishima H, Matsusue A, Umehara T, Murase T, Abe Y, Kubo SI, Yoshiura KI, Makita N, Ikematsu K. Postmortem genetic analysis of sudden unexpected death in infancy: neonatal genetic screening may enable the prevention of sudden infant death. *J Hum Genet*. 2017;62:989-995.
8. Nishiuchi S, Makiyama T, Aiba T, Nakajima K, Hirose S, Kohjitani H, Yamamoto Y, Harita T, Hayano M, Wuriyanghai Y, Chen J, Sasaki K, Yagihara N, Ishikawa T, Onoue K, Murakoshi N, Watanabe I, Ohkubo K, Watanabe H, Ohno S, Doi T, Shizuta S, Minamino T, Saito Y, Oginosawa Y, Nogami A, Aonuma K, Kusano K, Makita N, Shimizu W, Horie M, Kimura T. Gene-Based Risk

- Stratification for Cardiac Disorders in LMNA Mutation Carriers. *Circ Cardiovasc Genet*. 2017;10:e001603.
9. Kuroda Y, Yuasa S, Watanabe Y, Ito S, Egashira T, Seki T, Hattori T, Ohno S, Kodaira M, Suzuki T, Hashimoto H, Okata S, Tanaka A, Aizawa Y, Murata M, Aiba T, Makita N, Furukawa T, Shimizu W, Kodama I, Ogawa S, Kokubun N, Horigome H, Horie M, Kamiya K, Fukuda K. Flecainide ameliorates arrhythmogenicity through NCX flux in Andersen-Tawil syndrome-iPS cell-derived cardiomyocytes. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2017;9:245-256.
  10. 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*. 2017;14:717-724.
  11. Ishikawa T, Makita N, Aoki H, Saida Y. Letter to the Editor. *J Vet Intern Med*. 2017;31:967-968.
  12. Hu D, Li Y, Zhang J, Pfeiffer R, Gollob MH, Healey J, Harrell DT, Makita N, Abe H, Sun Y, Guo J, Zhang L, Yan G, Mah D, Walsh EP, Leopold HB, Giustetto C, Gaita F, Zienciuik-Krajka A, Mazzanti A, Priori SG, Antzelevitch C, Barajas-Martinez H. The Phenotypic Spectrum of a Mutation Hotspot Responsible for the Short QT Syndrome. *JACC: Clinical Electrophysiology*. 2017;3:727-743.
  13. Yagihara N, Watanabe H, Barnett P, Duboscq-Bidot L, Thomas AC, Yang P, Ohno S, Hasegawa K, Kuwano R, Chatel S, Redon R, Schott JJ, Probst V, Koopmann TT, Bezzina CR, Wilde AA, Nakano Y, Aiba T, Miyamoto Y, Kamakura S, Darbar D, Donahue BS, Shigemizu D, Tanaka T, Tsunoda T, Suda M, Sato A, Minamino T, Endo N, Shimizu W, Horie M, Roden DM, Makita N. Variants in the *SCN5A* Promoter Associated With Various Arrhythmia Phenotypes. *J Am Heart Assoc*. 2016;5:e003644.
  14. Okata S, Yuasa S, Suzuki T, Ito S, Makita N, Yoshida T, Li M, Kurokawa J, Seki T, Egashira T, Aizawa Y, Kodaira M, Motoda C, Yozu G, Shimojima M, Hayashiji N, Hashimoto H, Kuroda Y, Tanaka A, Murata M, Aiba T, Shimizu W, Horie M, Kamiya K, Furukawa T, Fukuda K. Embryonic type Na<sup>+</sup> channel beta-subunit, *SCN3B* masks the disease phenotype of Brugada syndrome. *Sci Rep*. 2016;6:34198.
  15. Nademanee K, Raju H, De Noronha S, 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. Reply: Search for Evidence-Based Medicine for Brugada Syndrome: The Complex Network of the Brugada Syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67:1658-9.
  16. Ishikawa T, Tsuji Y, Makita N. Inherited bradyarrhythmia: A diverse genetic background. *J Arrhythm*. 2016;32:352-358.
  17. Daumy X, Amarouch MY, Lindenbaum P, Bonnaud S, Charpentier E, Bianchi B, Nafzger S, Baron E, Fouchard S, Thollet A, Kyndt F, Barc J, Le Scouarnec S, Makita N, Le Marec H, Dina C, Gourraud JB, Probst V, Abriel H, Redon R, Schott JJ. Targeted resequencing identifies TRPM4 as a major gene predisposing to progressive familial heart block type I. *Int J Cardiol*. 2016;207:349-358.
  18. 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*. 2015;66:1976-86.
  19. Maharani N, Ting YK, Cheng J, Hasegawa A, Kurata Y, Li P, Nakayama Y, Ninomiya H, Ikeda N, Morikawa K, Yamamoto K, Makita N, Yamashita T, Shirayoshi Y, Hisatome I. Molecular Mechanisms Underlying Urate-Induced Enhancement of Kv1.5 Channel Expression in HL-1 Atrial Myocytes. *Circ J*. 2015;79:2659-68.
  20. Ishikawa T, Jou CJ, Nogami A, Kowase S, Arrington CB, Barnett SM, Harrell DT, Arimura T, Tsuji Y, Kimura A, Makita N. Novel mutation in the alpha-myosin heavy chain gene is associated with sick sinus syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2015;8:400-8.
  21. Hayashi K, Konno T, Tada H, Tani S, Liu L, Fujino N, Nohara A, Hodatsu A, Tsuda T, Tanaka Y, Kawashiri MA, Ino H, Makita N, Yamagishi M. Functional Characterization of Rare Variants Implicated in Susceptibility to Lone Atrial Fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2015;8:1095-104.
  22. Harrell DT, Ashihara T, Ishikawa T, Tominaga I, Mazzanti A, Takahashi K, Oginosawa Y, Abe H, Maemura K, Sumitomo N, Uno K, Takano M, Priori SG, Makita N. Genotype-dependent differences in age of manifestation and arrhythmia complications in short QT syndrome. *Int J Cardiol*.

2015;190:393-402.

〔学会発表〕(計 50 件)

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, Japan.
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. など

〔図書〕(計 5 件)

- 1 石川泰輔, 蒔田直昌. 不整脈症候群 - 遺伝子変異から不整脈治療を捉える - (ed 池田隆徳・清水渉・高橋尚彦) 82-85 南江堂 2015).
- 2 蒔田直昌. 不整脈のゲノムワイド解析はどこまで進んでいる? 167-168 診断と治療社, 2015
- 3 蒔田直昌. QT 短縮症候群とは? 166-167 診断と治療社, 2015
- 4 蒔田直昌. Progressive cardiac conduction disturbance (PCCD)とは? .164-165 診断と治療社, 2015
- 5 蒔田直昌. 遺伝子解析が有効な不整脈疾患は? 162-163 診断と治療社, 2015

〔産業財産権〕なし

〔その他〕なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

蒔田 直昌 (MAKITA, Naomasa)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授  
研究者番号: 00312356

### (2)研究分担者

牧山 武 (MAKIYAMA, Takeru)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号: 30528302

### (3)連携研究者

荒井 勇二 (ARAI, Yuji)  
独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・室長  
研究者番号: 30202724

### (4)連携研究者

石川 泰輔 (ISHIKAWA, Taisuke)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師  
研究者番号: 60708692