

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 9 月 24 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20894

研究課題名(和文) J波症候群における次世代シーケンサーを用いた包括的遺伝子解析

研究課題名(英文) Comprehensive genetic analysis for J wave syndrome using a next-generation sequencer

研究代表者

黒木 健志 (Kuroki, Kenji)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：50726940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は次世代シーケンサーを用いてJ波症候群(Brugada症候群、早期再分極症候群(ERS))症例の遺伝子異常を明らかにし、心室性不整脈による突然死の予防・治療に応用することである。

(1) Brugada症候群27症例中3例にSCN5A遺伝子変異を認めた。

(2) SCN5A遺伝子変異のないBrugada症候群4例、ERS 2例、特発性心室細動(IVF) 6例に包括的遺伝子解析を行い、IVF 2例で変異を認め(SCN5A、TBX5)、さらにERS 1例でこれまでに報告のない変異を見出した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to reveal the genetic abnormality of J wave syndrome (Brugada syndrome and early repolarization syndrome (ERS)), and to use it for the prevention and treatment of the sudden death from ventricular arrhythmias.

(1) Genetic abnormality was found in 3 of 27 patients with Brugada syndrome.

(2) Comprehensive genetic analysis was performed in 4 patients with Brugada syndrome who had no SCN5A genetic abnormality, 2 patients with ERS, and 6 patients with idiopathic ventricular fibrillation (IVF). Genetic abnormality was found in 2 IVF patients (SCN5A, TBX5), and new genetic abnormality was found in a ERS patient.

研究分野：不整脈

キーワード：次世代シーケンサー J波症候群

### 1. 研究開始当初の背景

現在、日本では年間約 10 万例の突然死が発生していると推定され、そのうち約 10%、年間約 1 万例は原因不明の心停止と取り扱われている。その多くは QT 延長症候群、Brugada (ブルガダ) 症候群、早期再分極症候群、特発性心室細動、カテコラミン誘発性多形性心室頻拍など遺伝性致死性不整脈疾患(いわゆるプライマリー不整脈疾患、あるいはチャネル病)によると考えられている。

このうち Brugada 症候群および早期再分極症候群は J 波増高という共通の心電図上の特徴を有し、心室細動による突然死のリスクを高める共通の臨床病態(= J 波症候群)として認識され、現在までにナトリウムチャネル SCN5A 遺伝子など 12 の共通の原因遺伝子が報告されている。しかしながら、臨床的に J 波症候群と診断された場合でも変異が検出される症例は約 15~30%と少なく、明確な発症機序や遺伝的背景が不明な症例が多い。さらに、心電図波形の変動が大きく、また、健康者(心室細動未発症者)にも J 波増高がしばしば認められることから、電気生理学的検査は診断感度・特異度に限界があり、突然死リスクを推測するのは非常に困難である。

したがって、原因遺伝子や遺伝子多様性を包括的に解析・データベース化し、これらの遺伝的基盤に基づいた病態解明や診断・治療法を選択、開発することは、テーラーメイド医療化を可能とし、心臓突然死を未然に予防、治療する上で大変重要である。

### 2. 研究の目的

本研究では、Brugada 症候群・早期再分極症候群(ERS) (= J 波症候群) 症例および特発性心室細動(IVF)症例に対し、SCN5A 遺伝子解析を行い、原因遺伝子を明らかにする。さらに SCN5A 遺伝子変異陰性例について次世代シーケンシングにより複数の関連遺伝子を包括的かつ体系的に解析し、J 波症候群あるいは特発性心室細動の病因を明らかにすること、さらに、変異が同定されなかった症例では全エクソーム解析などを行い、網羅的に遺伝子を探索することにより、新たな原因遺伝子を同定することが目的である。これらによって、遺伝子型、遺伝子変異、多型などの遺伝情報と臨床情報との関連を統計学的に検討し、遺伝子基盤に基づいたリスク層別化が可能かどうかを明らかにすることが目的である。

### 3. 研究の方法

(1) J 波症候群 (Brugada 症候群・早期再分極症候群) 症例の遺伝子解析

臨床所見から J 波症候群 (Brugada 症候群・早期再分極症候群) と診断された発端者症例、または特発性心室細動と診断された症例を対象とする。これまでの登録研究により、遺伝子解析に関する説明を行い、同意を得、ゲノム検体を保管している J 波症候群・特発性

心室細動症例、および今後診断され、遺伝子解析について同意が得られた症例を対象とする。遺伝子解析は疾患関連遺伝子のエクソン部位に対する特異的プライマーを用いたダイレクト・シーケンシング、あるいは次世代シーケンサー: Ion PGM および Ion Proton (Life Technologies 社) を用いて行う。次世代シーケンシングでは Cardiovascular Panel を用いて、チャネル遺伝子、細胞膜タンパク遺伝子、転写因子など、約 400 の心血管疾患関連遺伝子群を包括的に解析する。さらに、ターゲットシーケンシングで原因遺伝子が同定できない場合、特に家族性のある症例では全エクソーム解析を行う。全エクソーム解析にて得られる変異情報を Ingenuity Variant Analysis や annovar を用いて公開データベースと比較し、候補遺伝子変異を絞り込む。

(2) 遺伝子変異タイプと臨床的特徴や予後との関連

遺伝子変異の有無と重大な心血管イベント(心停止・心室細動)発生との関連性を明らかにする。またさまざまな臨床的な交絡因子とともに、遺伝子変異の有無が重大な心血管イベント(心停止・心室細動発生)に関連しているかどうかを多変量解析にて明らかにする。遺伝子変異の有無が心血管イベントに関連しているのであれば、遺伝子変異の部位・タイプによる予後に対する影響を明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) Brugada 症候群と診断され登録された 27 症例(有症候性 14 例、無症候性 13 例)につきサンガー法で SCN5A 遺伝子解析を施行したところ、3 例(11.1%; 有症候性 1 例、無症候性 2 例)において、SCN5A 遺伝子に有意と思われるミスセンス変異を認め( F1359C、E1573K、R1632C)。このうち R1632C 変異体のナトリウム電流は速い不活性化からの回復が著明に遅延しており、Brugada 症候群の病態に關与していることが報告されている。

次に、SCN5A 遺伝子変異を認めなかった Brugada 症候群 6 例、早期再分極症候群(ERS) 4 例、特発性心室細動(IVF) 7 例につき、Ion Torrent Cardiovascular Panel を用いて包括的に遺伝子解析を行った。検出されたバリエーションのうち、アミノ酸置換を伴い、かつ大規模データベースにおけるマイナーアレル頻度 0.5%未満のバリエーションをピックアップした。Annovar でアノテーションを行い、SIFT、PolyPhen2、Mutation Taster、FATHMM など 8 つの予測アルゴリズムの 7 つ以上で病的と判定されたものを病的変異の可能性ありと判定した。

その結果、Brugada 症候群では有意な病的変異を認めなかったが、IVF 2 例で有意な可能性のある変異を認め(28.5%, SCN5A: F532C,

TBX5: D110E) さらに ERS 1 例(25%)でこれまでに報告のない有意と考えられる変異を見出した。これらについては病態生理学的意義を検証するためにさらなる症例の解析に加え、変異体を作製し、細胞電気生理学的評価、あるいは遺伝子改変マウスなどによる実験的な検証が必要と考えられる。

(2) Brugada 症候群の SCN5A 遺伝子解析を行った 27 症例について、臨床背景と予後について検討した(表)。平均年齢 50.0±14.0 歳であり、25 例(92.6%)が男性であった。そのうち 3 例(11.1%)において、SCN5A 遺伝子に有意と思われるミスセンス変異を認めた(F1359C、E1573K、R1632C)。SCN5A 変異陽性であった 3 例のうち、1 例は診断時症候性、2 例は無症候性であった。また、3 例とも心臓突然死または Brugada 型心電図の家族歴を有していた。予後について、平均 24±28 か月の観察では、遺伝子解析を施行した Brugada 症候群 27 例中、2 例で心室細動を発症した。このうち SCN5A 遺伝子変異を有していたものはなく、2 例とも遺伝子変異陰性の症例であった。

これまでの報告で、Brugada 症候群で遺伝子変異の陽性率は SCN5A で 11-28%と比較的低率である 1)。ER は Brugada 症候群と類似性のある症候群であり、SCN5A や CACNA1C など、原因遺伝子の重複が報告されており、同様に遺伝子変異の陽性率は約 10-20%である。本研究では Brugada 症候群 27 症例中、SCN5A 遺伝子変異を 3 例(11.1%)で認め、従来の報告とほぼ同様、またはやや低率であり、さらに、SCN5A 遺伝子以外の遺伝子に有意な変異を見出すことができなかった。これまで、Brugada 症候群の遺伝子解析には、リスク層別化を含む臨床的意義はほとんど認められず、変異の有無と予後には関連がないという報告がほとんどであった。しか近年報告された日本の多施設共同研究では、発端者 415 人を平均 72 ヶ月長期経過観察し、SCN5A 変異陽性群は陰性群に比べて、初回心臓イベントの発症年齢が有意に若く、心事故発生率が高かったという報告がなされ、多変量解析では、SCN5A 変異と心停止蘇生の既往歴のみが心停止の予測因子であったと報告されている 2)。

今後、J 波症候群や特発性心室細動症例の遺伝子解析症例数を増やすとともに、バリエーションの絞り込みを行い、病的変異が疑われるものに対しては変異体を作製し、電気生理学的機能解析などによって、その遺伝子型の病態学的意義を検証する。また、症例数を増やしたうえで、臨床的予後との関連について明らかにしていく予定である。

(表) SCN5A 遺伝子解析を施行した Brugada 症候群 27 症例

性別	診断年齢	初発時	SCN5A	変異	予後
男=1 女=2		失神=1 心室細動・ 心停止=2	変異なし=0 変異あり=1		心室細動・心停止なし=0, あり=1
1	44	0	0		0
1	51	1	0		0
1	64	0	0		0
1	62	1	0		0
1	65	0	0		0
1	32	0	0		0
1	43	0	0		0
1	65	1	0		0
1	50	2	0		0
1	32	2	0		0
1	59	0	0		0
1	38	1	0		0
1	62	2	0		0
2	52	0	0		0
1	70	1	0		0
1	40	0	0		0
1	23	0	0		0
1	50	0	0		0
1	70	0	1	c.4717G>A, p.E1573K	0
1	63	0	0		0
1	51	2	1	c.4076T>G, p.F1359C	0
1	32	2	0		1
1	28	2	0		0
1	39	1	0		0
1	40	1	0		0
1	55	2	0		1
2	70	0	1	c.C4732T, p.R1578C	0

参考文献

1) Anzelevitch C. Genetic, molecular and cellular mechanisms underlying the J wave syndromes. *Circ J.* 2012; 76:1054-65.

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, Fukushima-Kusano K, Kamakura S, Yasuda S, Ogawa H, Miyamoto Y, Kapplinger J, Ackerman M, Shimizu W. Genotype-Phenotype Correlation of SCN5A Mutation for Clinical and Electrocardiographic Characteristics of Probands with Brugada Syndrome: A Japanese Multicenter Registry. *Circulation.* 2017; 135(23):2255-2270.

## 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)

- 1: Kuroki K, Sato A, Yamagami F, Nogami A, Aonuma K. Life-threatening aortic dissection with cardiac tamponade during catheter ablation for ventricular tachycardia originating from left coronary cusp. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2017 Jun 21. [Epub ahead of print]
- 2: Kuroki K, Nogami A, Yoshida K, Goya M, Fukunaga M, Kaitani K, Onishi N, Mine T, Koyama T, Igawa M, Machino T, Yamasaki H, Xu D, Igarashi M, Murakoshi N, Sekiguchi Y, Aonuma K. Efficacy of Intensive Radiofrequency Energy Delivery to the Localized Dense Scar Area in Post-Infarction Ventricular Tachycardia Ablation - A Comparative Study With Standard Strategy Targeting the Infarcted Border Zone. *Circ J*. 2017 Jun 3. [Epub ahead of print]
- 3: Kaneshiro T, Yoshida K, Sekiguchi Y, Tada H, Kuroki K, Kuga K, Kamiyama Y, Suzuki H, Takeishi Y, Aonuma K. Crucial role of pulmonary vein firing as an initiator of typical atrial flutter: Evidence of a close relationship between atrial fibrillation and typical atrial flutter. *J Arrhythm*. 2017 Apr;33(2):86-91.
- 4: Yamasaki H, Adachi T, Komatsu Y, Kuroki K, Sekiguchi Y, Nogami A, Aonuma K. Unexpected Electrical Isolation of the Superior Vena Cava During Radiofrequency Hot Balloon Ablation in the Right Superior Pulmonary Vein. *Circ J*. 2017 Apr 25;81(5):763-765.
- 5: Igarashi M, Tada H, Yamasaki H, Kuroki K, Ishizu T, Seo Y, Machino T, Murakoshi N, Sekiguchi Y, Noguchi Y, Nogami A, Aonuma K. Fragmented QRS Is a Novel Risk Factor for Ventricular Arrhythmic Events After Receiving Cardiac Resynchronization Therapy in Nonischemic Cardiomyopathy. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2017 Mar;28(3):327-335.
- 6: Seo Y, Ishizu T, Machino-Ohtsuka T, Yamamoto M, Machino T, Kuroki K, Yamasaki H, Sekiguchi Y, Nogami A, Aonuma K. Incremental Value of Speckle Tracking Echocardiography to Predict Cardiac Resynchronization Therapy (CRT) Responders. *J Am Heart Assoc*. 2016 Oct 19;5(10).
- 7: Talib AK, Nogami A, Morishima I, Oginosawa Y, Kurosaki K, Kowase S, Komatsu Y, Kuroki K, Igarashi M, Sekiguchi Y, Aonuma K. Non-Reentrant Fascicular Tachycardia: Clinical and Electrophysiological Characteristics of a Distinct Type of Idiopathic Ventricular Tachycardia. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2016 Oct;9(10). pii: e004177. PubMed PMID: 27729344.
- 8: Masuda K, Nogami A, Kuroki K, Igarashi M, Sekiguchi Y, Komatsu Y, Kowase S, Kurosaki K, Nishihara S, Niwa K, Tsuchiya T, Igawa M, Aonuma K. Conversion to Purkinje-Related Monomorphic Ventricular Tachycardia After Ablation of Ventricular Fibrillation in Ischemic Heart Disease. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2016 Sep;9(9).
- 9: Naruse Y, Nogami A, Shinoda Y, Hanaki Y, Shirai Y, Kowase S, Kurosaki K, Machino T, Kuroki K, Yamasaki H, Igarashi M, Sekiguchi Y, Aonuma K. J Waves Are Associated With the Increased Occurrence of Life-Threatening Ventricular Tachyarrhythmia in Patients With Nonischemic Cardiomyopathy. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2016 Dec;27(12):1448-1453.
- 10: Ishizu T, Seo Y, Igarashi M, Sekiguchi Y, Machino-Ohtsuka T, Ogawa K, Kuroki K, Yamamoto M, Nogami A, Kawakami Y, Aonuma K. Noninvasive Localization of Accessory Pathways in Wolff-Parkinson-White Syndrome by Three-Dimensional Speckle Tracking Echocardiography. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2016 Jun;9(6).
- 11: Nishikii-Tachibana M, Murakoshi N, Seo Y, Xu D, Yamamoto M, Ishizu T, Atsumi A, Machino-Ohtsuka T, Kuroki K, Yamasaki H, Igarashi M, Sekiguchi Y, Aonuma K. Prevalence and Clinical Determinants of Left Atrial Appendage Thrombus in Patients With Atrial Fibrillation Before Pulmonary Vein Isolation. *Am J Cardiol*. 2015 Nov 1;116(9):1368-73.
- 12: Seo Y, Ishizu T, Kawamura R, Yamamoto M, Kuroki K, Igarashi M, Sekiguchi Y, Nogami A, Aonuma K. Three-dimensional propagation imaging of left ventricular

activation by speckle-tracking echocardiography to predict responses to cardiac resynchronization therapy. J Am Soc Echocardiogr. 2015 May;28(5):606-14. doi:

13: Igarashi M, Nogami A, Sekiguchi Y, Kuroki K, Yamasaki H, Machino T, Yui Y, Ogawa K, Talib AK, Murakoshi N, Kuga K, Aonuma K. The QRS morphology pattern in V5R is a novel and simple parameter for differentiating the origin of idiopathic outflow tract ventricular arrhythmias. Europace. 2015 Jul;17(7):1107-16.

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

黒木 健志 KENJI KUROKI (筑波大学附属病院 病院講師)

研究者番号 : 50726940

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし

##### (4)研究協力者

青沼和隆 KAZUTAKA AONUMA (筑波大学医学医療系 教授)

関口幸夫 YUKIO SEKIGUCHI (同 准教授)

五十嵐都 MIYAKO IGARASHI (同 講師)

村越伸行 NOBUYUKI MURAKOSHI (同 講師)

許 東洙 TOSHU KYO (同 助教)

井坂由美 YUMI ISAKA (同 専門職員)