

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390212
 研究課題名 (和文) イオンチャネル病としての遺伝性不整脈の遺伝型・表現型関連の研究
 研究課題名 (英文) Genotype - phenotype relation study on inherited cardiac arrhythmias as ion channel diseases
 研究代表者
 堀江 稔 (HORIE MINORU)
 滋賀医科大学 医学部 教授
 研究者番号：90183938

研究成果の概要 (和文)：遺伝性不整脈の一部は、収縮を司る蛋白分子である心筋のイオン・チャネルやその調節蛋白をコードする遺伝子の変異や多型 (単一塩基多型=Single Nucleotide Polymorphism 以下 SNP) のためにチャネルの働きが変化して発症する病気、すなわち『イオン・チャネル病』であることが分かってきた。中でもQT延長症候群は、著しいQT時間の延長とtorsade de pointes (以下TdP) を起こす家族性LQTSは比較的若年者に見られ、心臓突然死を起こすことから多くの研究者が行われてきた。本研究課題では、QT延長症候群における遺伝子異常と病像との関連について機能解析を通して解明した。ひとつは、薬剤性を含む2次性QT延長症候群における遺伝的な背景を明らかにした。ついで、2次性QT延長症候群の発症に従来、関与されると報告されていたKCNE1のSNPであるD85Nが、実際、病像を発現し得る、いわゆるDisease-causing SNPであることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

A part of inherited arrhythmias is now known to result from a variety of genetic variants in genes encoding cardiac ion channels and their modulating proteins. There are at least two different types of genetic variants: mutations and single nucleotide polymorphism (SNP). Among the inherited arrhythmia, congenital long QT syndrome (LQTS) is a disorder defined by prolongation of the QT interval. Patients with LQTS are predisposed to fatal ventricular tachycardia - torsade de pointes (TdP) - leading to recurrent syncope or sudden cardiac death. Syncope or sudden death could be the first and the only manifestation. LQTS affects an estimated 1 in 2,000 people.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2008年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：循環器内科学

キーワード：生理学、遺伝子、蛋白質、イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

遺伝性不整脈は、近年の分子遺伝学の進歩により明らかにされた新しい概念で、心筋イオンチャンネル遺伝子、あるいは、その調節蛋白遺伝子の多種多様な変異により招来されるチャンネル病であることが判明した。

2. 研究の目的

われわれは1996年から2次性を含めたQT延長症候群をはじめとする遺伝性不整脈患者の遺伝子検索と発見された変異チャンネルの機能解析を行っている。2009年3月の段階で1430名の遺伝性不整脈患者のゲノムDNAを集積した。本研究課題では、遺伝性不整脈の致死的な不整脈を予防し治療するため、これらのゲノムDNAに対して広範かつ網羅的に不整脈関連遺伝子の検索を行い、同時に、新規責任遺伝子の候補についても検討するのが目的である。また、遺伝子異常(変異・SNP=単一塩基多型)が同定された症例については疾患の表現型と遺伝型の連関を明らかにする。

3. 研究の方法

関連遺伝子の広範な検索と診断：

現在、集積している遺伝性不整脈症例(1070例)において広範かつ網羅的な遺伝子検査を行うと共に、日本人に特異的なSNPに関しては、滋賀地区でのコホート研究で得られた一般住民のデータについても検索する。一部の遺伝子についてはすでに滋賀医科大学倫理委員会の承認を受けている。また、遺伝子検索ではエクソンのみならずイントロン内の遺伝子配列にも注目する。イントロン内genetic variantsはスプライシングの異常を引起す可能性があるため、すでに発見しているイントロン内異常についても、数エクソン-イントロン・コンプレックスを含むミニゲノムを培養細胞内に導入し、その中でスプライシングの状況を転写産物のmRNAを調べることにより判定する方法で検討する(Exon Trap法)。分子遺伝学あるいは工学の進歩により、より大きなDNAを簡便に取り扱うことが可能となってきた。スプライシング異常など

post-transcriptional regulationの異常を発見し、その機序を明らかにすることが以前より容易になっている。このような方法で、異常の存在が疑われる場合、患者さんの末梢血より分離するpoly RNAからのreal time PCRによる定量的なPCRによる異常スプライシングの検出を試みる。

未知の不整脈関連遺伝子の同定：

最近、我々は、予備的な研究で、未報告のイオンチャンネル遺伝子において複数の変異を発見した。現在、培養細胞を用いて、その変異が及ぼす機能変化について解析を行っている。また、カテコラミン感受性多形性心室頻拍(CPVT)は、運動に伴い発症し、非常に死亡率の非常に高い遺伝性不整脈であるが、近年、心筋細胞内カルシウムの調節に関わる蛋白の一つであるリアノジン受容体の遺伝子変異が原因であることが報告された。これに関連して、FKBP(リアノジン受容体のFK部位に結合する蛋白)、プロテインキナーゼAなどの候補遺伝子についても検討する。不整脈源性右室異形成・心筋症(ARVD/C)は、形態学的な異常を伴う不整脈疾患であるが、近年の研究で、心筋細胞間の接着に関与するデスマゾーム分子の機能障害により発症することが分かってきた。われわれの予備的な検討でも、日本に多いことが判明した。右室の形態的な変化が軽微であり、心室性不整脈のみが臨床像として出現する病態早期の症例では、遺伝性不整脈との鑑別は難しく、われわれの1000例を超すコホートのなかにも少なからず含まれている(紛れ込んでいる)。また、ARVD/Cでは、デスマゾーム関連を含めて未だ知られていない原因遺伝子の候補があるため、これらについて新規関連遺伝子の検出を試みる。

4. 研究成果

遺伝性不整脈の一部は、収縮を司る蛋白分子である心筋のイオン・チャンネルやその調節蛋白をコードする遺伝子の変異や多型(単一塩基多型=Single Nucleotide Polymorphism以下SNP)のためにチャンネルの働きが変化して発症する病気、すなわち『イオン・チャンネル病』であることが分かってきた。中でもQT延長症候群は、著しいQT時間の延長とtorsade de pointes(以下TdP)を起こす家族性LQTSは比較的若年者に見られ、心臓突然死を起こすことから多くの研究者が行われてきた。本研究課題では、QT延長症候群における遺伝子異常と病像との関連について機能解析を通して解明した。ひとつは、薬剤性を含む2次性QT延長症候群における遺伝的背景を明らかにした。われわれの経験した20例の薬剤性QT延長/TdPでは、実に、40%の頻度でQT延長症候群関連遺伝子の変異が発見された。その頻度はいわゆる家族性QT延長症候群におけるよりも低いものの統計学的な有意差を認めなかった。また、抗不整脈薬以外の薬物でTdPを起こしたケース

ほど、遺伝子変異の発見率は高かった (Itoh H et al, Latent genetic backgrounds and molecular pathogenesis in drug-induced long QT syndrome. Circulation EP and Arrhythmia, 2009)。ついで、2次性QT延長症候群の発症に従来、関与されると報告されていた KCNE1 の SNP である D85N が、実際、病像を発現し得る、いわゆる

Disease-causing SNP であることを報告した。遺伝子多型の中でも一番頻度高い SNP は数十から数千塩基にひとつの頻度で存在する塩基配列の変化であり、これによりヒトの個性や特性を決定するとされる。近年、このような SNP の中にはコードする蛋白の機能障害を起こして病気と関連することが分かってきたが、QT 延長症候群において D85N は、まさにこのような病因であることが判明した (Nishio et al, D85N, a KCNE1 polymorphism, is a disease-causing gene variant in long QT syndrome. Journal of American College of Cardiology, 2009)。

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 123 件)

1. Yasuda S, Tsuji K, Horie M, et al: A family of hereditary long QT syndrome caused by Q738X HERG mutation. Int J Cardiol. (in press) (6人中5・6番目、査読有り)
2. Yamamura K, Horie M, et al: A novel SCN5A mutation associated with the linker between III and IV domains of Na(v)1.5 in a neonate with fatal long QT syndrome. Int J Cardiol. (in press) (11人中10番目、査読有り)
3. Watanabe H, Itoh H, Horie M, et al: High prevalence of early repolarization in short QT syndrome. Heart Rhythm 7;647-652, 2010. (15人中8・13番目、査読有り)
4. Ishida K, Horie M, et al: P-wave and the development of atrial fibrillation. Heart Rhythm 7;289-294, 2010. (7人中7番目、査読有り)
5. Ozeki Y, Horie M, et al: QTc prolongation and antipsychotic medication in 1017 patients with schizophrenia. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 34; 401-405, 2010. (12人中11番目、査読有り)
6. Horigome H, Horie M, et al: Clinical characteristics and genetic background of congenital long QT syndrome diagnosed in fetal, neonatal and infantile life. A nation-wide questionnaire survey in Japan. Journal of American College of Cardiology 3;10-17, 2010. (35人中35番目、査読有り)
7. Wu J, Itoh H, Horie M, et al: KCNE2 modulation of Kv4.3 current and its potential role in fatal rhythm disorders. Heart Rhythm 7;199-205, 2010. (18人中6・18番目、査読有り)
8. Irar T, Horie M, et al: Evaluation of channel function after alteration of amino acid residues at the pore center of KCNQ1 channel. BBRC 378(3);589-94, 2009. (8人中7番目、査読有り)
9. Zankov DP, Tsuji K, Horie M, et al: Adrenergic regulation of the rapid component of delayed rectifier K⁺ current: Implications for arrhythmogenesis in LQT2 patients. Heart Rhythm 6(7);1038-1046, 2009. (7人中3・7番目、査読有り)
10. Itoh H, Horie M, et al: Aorto-Pulmonary artery dissection. Journal of American College of Cardiology 54(21):1990, 2009. (7人中1・7番目、査読有り)
11. Itoh H, Horie M, et al: A novel KCNH2 mutation as a modifier for short QT interval. Int J Cardiol 137(1):83-5, 2009. (12人中1・12番目、査読有り)
12. Ohno S, Tsuji K, Horie M, et al: Novel KCNE3 mutation reduces repolarizing potassium current and associated with long QT syndrome. Hum Mutat 30:557-563, 2009. (15人中6・15番目、査読有り)
13. Ogawa S, J-RHYTHM Investigators, et al: Optimal treatment strategy for patients with paroxysmal atrial fibrillation: J-RHYTHM Study.

- Circ J 73:242-8, 2009. (25人中25番目、査読有り)
14. Zankov DP, Horie M, et al: Angiotensin II type 1 receptor mediates partially hyposmotic-induced increase of I_{Ks} current in guinea pig atrium. Pflugers Archiv-European Journal of Physiology 458:837-849, 2009. (5人中5番目、査読有り)
 15. Nishio Y, Horie M, et al: D85N, a KCNE1 polymorphism, is a disease-causing gene variant in long QT syndrome. Journal of American College of Cardiology 54(9); 812-9, 2009. (15人中3・15番目、査読有り)
 16. Kamakura S, Horie M, et al: Long-term prognosis of probands of Brugada-pattern ST-Elevation in leads V1-V3. Circulation Arrhythmia and Electrophysiology 2(5);495-503, 2009. (22人中6番目、査読有り)
 17. Itoh H, Horie M, et al: Latent genetic backgrounds and molecular pathogenesis in drug-induced long QT syndrome. Circulation Arrhythmia and Electrophysiology 2(5)511-23, 2009. (30人中1・30番目、査読有り)
 18. Ohno S, Horie M, et al: A novel mutation associated with Jervell and Lange-Nielsen syndrome in a Japanese family. Circ J 72(5); 687-693, 2008. (10人中10番目、査読有り)
 19. Sakaguchi T, Itoh H, Tsuji K, Horie M, et al: Age- and genotype-specific triggers for life-threatening arrhythmia in the genotyped long-QT syndrome. J Cardiovasc Electrophysiol 19(8); 794-799, 2008. (14人中3・10・14番目、査読有り)
 20. Nagaoka I, Itoh H, Horie M, et al: Mutation site dependent variability of cardiac events in LQT2 form of congenital long-QT syndrome. Circ J 72(5); 694-699, 2008. (13人中3・13番目、査読有り)
 21. Makiyama T, Tsuji K, Itoh H, Horie M, et al: A novel SCN5A gain-of-function mutation M1875T associated with familial atrial fibrillation. J Am Coll Cardiol 52(16);1326-1334, 2008. (13人中9・10・13番目、査読有り)
 22. Tamaki S, Horie M, et al: The factors contributing to whether or not hypertensive patients bring their home blood pressure record to the outpatient exam. Intern Med 47(18): 1561-1565, 2008. (8人中8番目、査読有り)
 23. Makiyama T, Tsuji K, Horie M, et al: Mutation analysis of the glycerol-3 phosphate dehydrogenase-1 like (GPD1L) gene in Japanese patients with Brugada syndrome. Circ J 72; 1705-1706, 2008. (9人中4・9番目、査読有り)
 24. Makita N, Horie M, Itoh H, et al: The E1784K mutation in SCN5A is associated with mixed clinical phenotype of type 3 long QT syndrome. J Clin Invest 118(6); 2219-2229, 2008. (19人中4・11番目、査読有り)
 25. Sakaguchi T, Itoh H, Tsuji K, Horie M, et al: Hydroxyzine, a First Generation H1-Receptor Antagonist, Inhibits Human Ether-a-go-go?Related Gene (HERG) Current and Causes Syncope in a Patient With the HERG Mutation. J Pharmacol Sci 108; 462-471, 2008. (14人中2・4・14番目、査読有り)
 26. Horie M, et al: Genetic background of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/Cardiomyopathy: Time to start asian registry!. Journal of Arrhythmia 24; 195-199, 2008. (5人中1番目、査読有り)
 27. Zankov D, Horie M, et al: Angiotensin II type 1(AT) receptor and swelling-activated increase of the slow component of the delayed rectifier K⁺ current (I_{Ks}) in guinea pig atrial cells. J Physiol Sci 57; S227, 2007. (5人中5番目、査読有り)
 28. Haruna Y, Tsuji K, Horie M, et al: Genotype-phenotype correlations of KCNJ2 mutations in Japanese patients with Andersen-Tawil syndrome. Hum Mutat. 28(2); 208, 2007. (21人中7・20番目、査読有り)

29. Ohno S, Tsuji K, Itoh H, Horie M, et al; N- and C-terminal KCNE1 mutations cause distinct phenotypes of long QT syndrome. *Heart Rhythm* 4(3); 332-40, 2007. (10人中4・6・10番目、査読有り)
30. Toda H, Horie M, et al: Stimulatory action of protein kinase C ϵ isoform on the slow component of delayed rectifier K(+) current in guinea-pig atrial myocytes. *Br J Pharmacol* 150;1011-1021, 2007. (7人中7番目、査読有り)
31. Tsuji K, Horie M, et al; Mechanistic basis for the pathogenesis of long QT syndrome associated with a common splicing mutation in KCNQ1 gene. *J Mol Cell Cardiol* 42(3); 662-669, 2007. (12人中1・12番目、査読有り)
32. Itoh H, Tsuji K, Horie M, Imoto K. A paradoxical effect of lidocaine for the N406S mutation of SCN5A associated with Brugada syndrome. *Int J Cardiol* 121(3); 249-252, 2007. (11人中1・2・11番目、査読有り)
33. Horie M, Ito H. Disorders of Cardiac Repolarization-Long QT and Short QT Syndromes-. *Circ J* 71; A50-53. 2007. (査読有り)
34. Crotti L, Horie M, et al: The Common Long QT Syndrome Mutation KCNQ1/A341V Causes Unusually Severe Clinical Manifestations in Patients with Different Ethnic Backgrounds: Toward a Mutation-specific Risk Stratification. *Circulation* 116; 2366-2375, 2007. (16人中12番目、査読有り)
35. Sumitomo N, Horie M, et al: on of Atrial Arrhythmia and Sinus Node Dysfunction in Patients with Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circ J* 71(10);1606-1609, 2007. (14人中12番目、査読有り)
- [学会発表] (計 159件)
1. Ohno S, Tsuji K, Makiyama T, Nishio Y, Akao M, Kita T, Horie M: Multiple mechanisms underlie long QT syndrome by the change of amino acid R259 in the intracellular S4-S5 linker of KCNQ1. *Cardiorhythm*2009. (2009.2.20-22, Hong Kong) .
2. Horie M:Overlap syndromes in inherited arrhythmia disorders. *ISHNE* 2009(2009.6.4-6 横浜).
3. Horie M. Structure-function relationships of K channels. 2nd Asia pacific heart rhythm society science session(APHRS2009). (2009.10.22-25, Beijing, China).
4. Horie M: Mechanistic basis of heart rhythm disorders in ion channel diseases. 第73回日本循環器学会総会・学術集会. (2009.3.20-22, 大阪).
5. Ito M, Nakazawa Y, Yao T, Ashihara T, Joh H, Itoh H, Sugimoto Y, Horie M: Event ECG recording is useful tool for atrial fibrillation (AF) recurrence after pulmonary vein isolation (PVI). 第73回日本循環器学会総会・学術集会. (2009.3.20-22, 大阪).
6. Itoh H, Watanabe E, Watanabe I, Sakaguchi T, Makiyama T, Akao M, Oono S, Zenda N, Higashi Y, Mori C, Okajima K, Matsuura H, Horie M: Latent genetic backgrounds and molecular pathogenesis of drug-induced long QT syndrome. 第73回日本循環器学会総会・学術集会. (2009.3.20-22, 大阪).
7. Itoh H, Shimizu W, Yamagata K, Sakaguchi T, Oono S, Makiyama T, Akao M, Noda T, Miyamoto Y, Kamakura S, Horie M: Severer phenotypes of long QT syndrome are associated with compound mutations: A multicenter study. 第73回日本循環器学会総会・学術集会. (2009.3.20-22, 大阪).
8. Makita N, Behr E, Shimizu W, Horie M, Crotti L, Itoh H, Miyamoto K, Kamakura S, Tsutsui H, Schwartz PJ, George AL Jr, Roden DM. Overlap Between LQT3 and Brugada Syndrome: Clinical Features in a Common Mutation and Underlying Biophysical Mechanisms. *The American Heart Association Scientific Sessions* 2007. (2007.11.5, U.S.A) .
9. Makiyama T, Akao M, Shizuta S, Doi T, Ohno S, Nishio Y, Kimura T, Horie M.

Familial Dilated Cardiomyopathy with Conduction Disease Caused by a Lamin A/C Mutation: Efficacy of the Cardiac Resynchronization Therapy with a Defibrillator. The American Heart Association Scientific Sessions 2007. (2007.11.5, U.S.A) .

〔図書〕 (計 11 件)

1. 堀江 稔: 心房細動 今日の治療方針 私はこう治療している 2010 年度版。医学書院 東京 300-302, 2010.
2. 堀江 稔: Annual Review 循環器 2010: ARB/ACE-I による心房細動抑止効果。中外医学社 東京 182-188, 2010.
3. 堀江 稔: 脚ブロック 循環器疾患最新の治療 2010-2011。南江堂 東京 287-290, 2010.
4. 堀江 稔: QT 延長症候群 循環器疾患のサイエンス。南山堂 東京 155-159, 2010.
5. 堀江 稔: 今日の治療方針 私はこう治療している 2010 年度版: 心房細動。医学書院 東京 300-302, 2010.
6. 堀江 稔 (共著): 重篤副作用疾患別対応マニュアル: 心室頻拍。厚生労働省 東京 1-20, 2009.
7. 堀江 稔: 心房リモデリング. 最新医学別冊 新しい診断と治療の ABC15 循環器 2 心房細動 (改訂第 2 版) 最新医学社 大阪 59-66, 2009.
8. 堀江 稔. 不整脈治療薬の催不整脈作用. 循環器病疾患最新の治療. 南江堂 東京 325-326. 2008.
9. 堀江 稔, 奥村 謙, 小野克重, 平岡昌和. 不整脈予防における ARB, ACE 阻害薬とアルドステロン拮抗薬. 株式会社ライフメディコム 東京 編集, 2008.
10. 堀江 稔. 不整脈とイオン・チャネル病. 循環器内科治療ガイドライン—最新の診療指針—. 総合医学社 東京 184-185, 2008.
11. 伊藤英樹, 堀江 稔. 致死性不整脈の遺伝子診断. Annual Review 循環器 2007. 中外医学社 東京 191-195, 2007.

〔その他〕

ホームページ等

http://www.shiga-med.ac.jp/~hqmed1/shiga_image/top.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀江 稔 (HORIE MINORU)
滋賀医科大学 医学部 教授
研究者番号: 90183938

(2) 研究分担者

伊藤 英樹 (ITOH HIDEKI)
滋賀医科大学 医学部 助教
研究者番号: 30402738

辻 啓子 (TSUJI KEIKO)
滋賀医科大学 医学部 特任助教
研究者番号: 70432309