

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17113

研究課題名(和文) SNTA1変異による早期再分極症候群発症メカニズムの解明に関する研究

研究課題名(英文) The research project about the association between SNTA variant and Early depolarisation syndrome

研究代表者

加藤 浩一 (Kato, Koichi)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：70736983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、遺伝性不整脈の原因となる心臓イオンチャネルの機能異常に、チャネル結合タンパクの遺伝子異常が関与しているという仮説の元で行われている研究の一環である。Brugada症候群家系に同定されたチャネル結合蛋白遺伝子SNTA1の変異に注目して解析したが、培養細胞で変異がもたらすNa電流変化はわずかであった。そこで、並行して行っていた他のチャネル結合蛋白、カルモジュリンの遺伝子CALM3の変異解析にリソースを振り分けた。こちらでは、見つかった変異がK電流にも影響を与えること、それが表現型をやや軽症にしている可能性を報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して、遺伝性不整脈の原因としてチャネル遺伝子そのものの異常だけでなく、チャネル結合蛋白の遺伝子異常が、疾患の表現型に与える影響というものへの理解がまた一つ深まったといえる。現状保険適応となっている遺伝性不整脈の遺伝子検査では、チャネル結合蛋白遺伝子の配列を読むことまでは可能だが、その配列異常(遺伝子異常)が実際に検査を受けた患者さんの病態と本当に関係があるのか、あるとすればどのような重症度で、どのような臨床症状を引き起こすのか、などまできちんと評価できる検査機関はない。本研究の成果がそのような臨床での遺伝子検査の結果解釈の一助となれば良いと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we first analysed the functional effect of SNTA1 genetic variant found in a family with Brugada syndrome. However, in an over expression system using HEK293 cells, the variant's effect was fairly small. Thus, we allocated a part of our resources to another variant in another channel interacting protein "calmodulin". By functional analyses, we found the detected variant affected not only ICaL, but also IKs, which possibly produced relatively milder phenotype of the affected family members.

研究分野：遺伝性不整脈

キーワード：Brugada症候群 SNTA1 SCN5A 遺伝性QT延長症候群 CALM3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

働き盛りの成人が不整脈で突然死する早期再分極症候群 (Early Repolarization Syndrome: ERS) の原因は、未だよくわかっていない。心臓ナトリウム(Na)チャネル遺伝子SCN5Aの異常によるNa電流の低下が重要視されているが、SCN5A変異が見つかるケースはERS全体で2割以下で、他の原因遺伝子検索が続いている。ジストロフィン関連タンパクの α -1-Syntrophinは、Naチャネルと結合してその調整を行う。今回我々は、ERSやそれと類似した病型を取る3家系に、3種類のSNTA1遺伝子異常を同定した。これらの変異がどのようにERSを引き起こしたのかを明らかにすることが本研究の目的である。

2. 研究の目的

心電図上のST上昇と青壮年期の不整脈死を特徴とするブルガダ症候群やJ波症候群は、一見健全な成人を襲う突然死症候群として重要である。近年、これらの疾患を早期再分極症候群 (Early Repolarization Syndrome: ERS) として一括りにする概念が出てきている。ERSの原因として、心臓ナトリウム(Na)チャネル遺伝子SCN5Aの異常によるNa電流低下が重要視されているが、SCN5A変異同定率はERS全体で2割を大きく下回り、他の原因遺伝子検索が続いている。ジストロフィン関連タンパクである α -1-Syntrophinは、Naチャネルと結合してその調整を行う。我々は、今回ERSやそれと類似した病型を取る3家系に、3種類のSNTA1遺伝子異常を同定した。これらの変異がどのような機序でERSを引き起こしたのかを明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

実験のステップは大きく分けて2つに分かれ、ステップ1は培養細胞を用いたPilot study、ステップ2はiPS心筋を用いた機能解析である。ステップ1) 培養細胞におけるSNTA1変異の機能解析まずはじめに、培養細胞を用いた強制発現系にてパッチクランプ法を用いた心臓ナトリウム電流の機能解析を行う。使用する細胞はHEK293とし、SNTA1プラスミドは既に米国の研究者より入手済みである。今回同定した3種類の遺伝子変異はQuikchangeIIXL 遺伝子変異導入キットでSNTA1プラスミドに導入し、作成した変異プラスミドをSCN5Aプラスミドと共にHEK293にトランスフェクションし、Whole-cellパッチクランプにてナトリウム電流を測定する。この実験によりSNTA1変異が心臓ナトリウム電流に与える影響を調べる。この手法の問題点として、SNTA1が多くの細胞に普遍的に発現しているため、変異SNTA1を強制発現させたところで、細胞自体が元々有している内因性の野生型SNTA1によってその効果がキャンセルされる、またはカバーされてしまう可能性があげられる。これに対しては、適宜SNTA1のプラスミド量を増やすことである程度解決できると考えている。

ステップ2) iPS心筋を用いたSNTA1変異の及ぼす影響の確認このステップでは、①患者由来iPS心筋細胞を用いて、もしくは②iPS心筋細胞へSNTA1遺伝子変異をノックインして、電気生理学実験を行う。現在家系1 (SNTA1 p.R373C)については患者の協力が得られ、患者由来iPS細胞を作成する目処が付いているが、他の2家系についてはCRISPR-Cas9で健常者由来iPS心筋細胞のSNTA1遺伝子を編集し、今回同定された遺伝子変異を導入する。遺伝子編集iPS心筋株が樹立できれば、心筋活動電位の測定とナトリウム電流の測定をパッチクランプにて行う。iPS心筋の作成や遺伝子編集は共同研究を行っている京都大学牧山研究室で実施する。iPS心筋細胞への遺伝子編集は効率が低く難しいが、現在我々は各種条件の最適化で従前よりも編集効率を大きく向上させている。

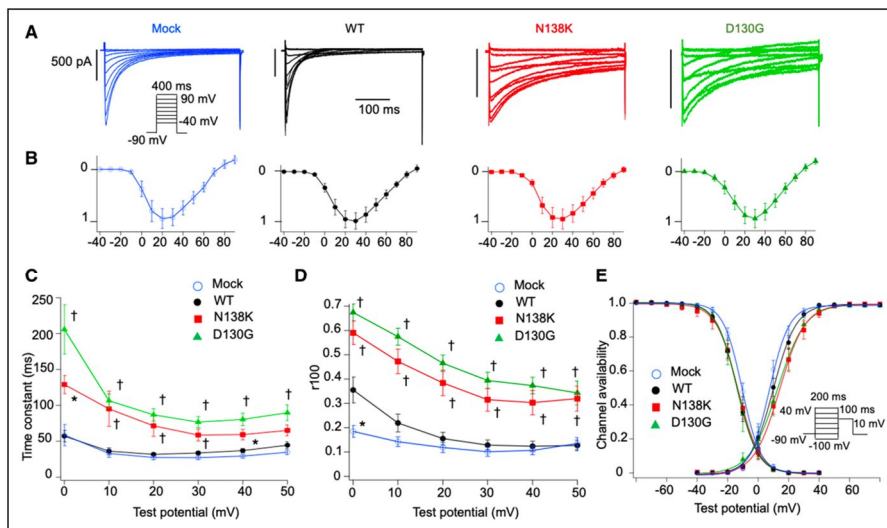
4. 研究成果

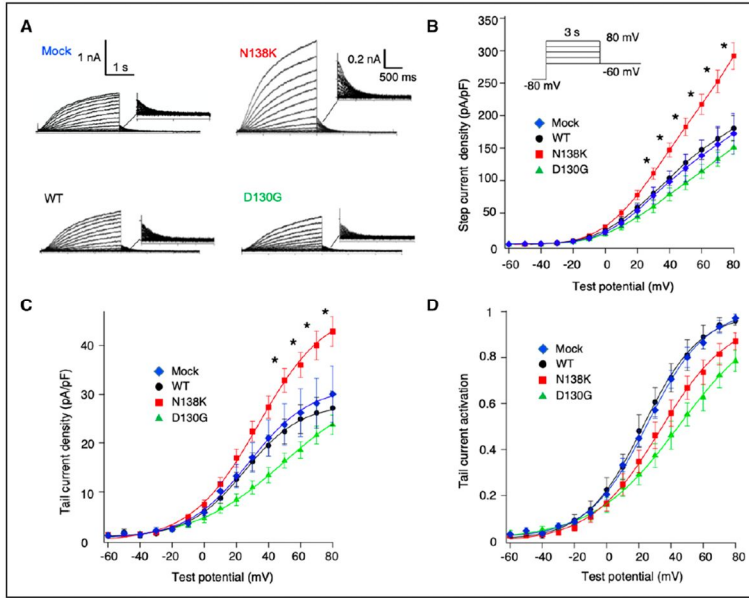
本研究では、Brugada症候群に類似した病型をとる家系に同定されたイオンチャネル結合タンパク、 α シトロフィンの遺伝子、SNTA1の遺伝子変異を解析してきた。しかし、培養細胞系（HEK293）で、同定された変異がもたらすNa電流の減少程度がわずかであったことと、患者からのiPS細胞作成の協力が得られなかったことから、SNTA1の解析にこれ以上のリソースを投入する事を一旦再考した。我々はSNTA1に並行して、他のチャネル結合タンパクについても遺伝子変異の検索と機能解析を行っていたが、QT延長家系に同定されたカルモジュリンのコード遺伝子CALM3の変異の機能解析では、L型カルシウム電流の減衰時間の延長という、より有望な結果が得られた。そこで、リソースの一部をCALM3の解析に振り分けて、機能解析を継続した。

CALM3変異の解析で得られた主な結果は、1) カルモジュリン変異 p. N138Kは既報のCaM変異同様L型カルシウム電流の不活性化を障害する(下図1) 2) 変異カルモジュリンのカルシウム結合能は低下しているが既報の変異に比べると程度としては軽く、それがこの変異が見つかったQT延長家系が重症化しにくかった原因の一つと推察される、3) カリウム電流にも影響を与え、IKs電流増加に寄与する(下図2)、の主に3点であった。これらの結果をまとめ、本年3月に論文として上梓した。(Kato et al *CircArrhythm Electrophysiol.* 2022

Mar;15(3):e010572)

図 1





5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kato Koichi, Isbell Holly M., Fressart V?ronique, Denjoy Isabelle, Debbiche Amal, Itoh Hideki, Poinot Jacques, George Alfred L., Coulombe Alain, Shea Madeline A., Guicheney Pascale	4. 巻 15
2. 論文標題 Novel <i>CALM3</i> Variant Causing Calmodulinopathy With Variable Expressivity in a 4-Generation Family	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology	6. 最初と最後の頁 epub
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCEP.121.010572	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kojima Katsumi, Kato Koichi, Fujii Yusuke, Okuyama Yusuke, Ohno Seiko, Ozawa Tomoya, Horie Minoru, Nakagawa Yoshihisa	4. 巻 61
2. 論文標題 Successful Management of a Young Athlete with Type 2 Long QT Syndrome by Genotype-specific Risk Stratification and Bridging Therapy with a Wearable Cardioverter Defibrillator	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 1179 ~ 1182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.8093-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukuyama Megumi, Horie Minoru, Aoki Hisaaki, Ozawa Junichi, Kato Koichi, Sawayama Yuichi, Tanaka-Mizuno Sachiko, Makiyama Takeru, Yoshinaga Masao, Nakagawa Yoshihisa, Ohno Seiko	4. 巻 epub
2. 論文標題 School-based routine screenings of electrocardiograms for the diagnosis of long QT syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 EP Europace	6. 最初と最後の頁 epub
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/europace/euab320	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Peltenburg Puck J., Kallas Dania, Bos Johan M., Lieve Krystien V.V., Kato Koichi, Barc Julien, Till Jan, Probst Vincent, Brugada Ramon, Shimizu Wataru, Horie Minoru, Leenhardt Antoine, Ackerman Michael J., Sanatani Shubhayan, van der Werf Christian, Wilde Arthur A.M.	4. 巻 145
2. 論文標題 An International Multicenter Cohort Study on β -Blockers for the Treatment of Symptomatic Children With Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 333 ~ 344
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.056018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirose Sayako, Murayama Takashi, Tetsuo Naoyuki, Hoshiai Minako, Kise Hiroaki, Yoshinaga Masao, Aoki Hisaaki, Fukuyama Megumi, Wuriyanghai Yimin, Wada Yuko, Kato Koichi, Makiyama Takeru, Kimura Takeshi, Sakurai Takashi, Horie Minoru, Kurebayashi Nagomi, Ohno Seiko	4. 巻 24
2. 論文標題 Loss-of-function mutations in cardiac ryanodine receptor channel cause various types of arrhythmias including long QT syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EP Europace	6. 最初と最後の頁 497 ~ 510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/europace/euab250	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Koichi Kato , Seiko Ohno , Keiko Sonoda , Takeru Makiyama , Tomoya Ozawa , Yoshihisa Nakagawa , Minoru Horie
2. 発表標題 LMNA missense mutation causes nonsense-mediated mRNA decay and severe dilated cardiomyopathy.
3. 学会等名 日本不整脈心電学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuichi Sawayama, Koichi Kato, Masahiko Ajiro, Ryo Kurosawa, Megumi Fukuyama, Seiko Ohno, Yoshihisa Nakagawa, Minoru Horie
2. 発表標題 A Synonymous SCN5A Variant p.E446E Causing Brugada Syndrome via Cryptic Donor Site Splicing
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------