

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：20K17146

研究課題名(和文) リアノジン受容体チャネル変異陽性QT延長症候群の診断と発症メカニズムに関する研究

研究課題名(英文) A research for the diagnosis of RYR2-positive LQTS and its arrhythmogenicity

研究代表者

藤居 祐介 (Fujii, Yusuke)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：10837868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、当初LQTS患者とQT延長合併CPVT患者を比較し、両者の臨床像を明らかにすることと、一部のRYR2変異がQT延長を起こすメカニズムを解明することを目的としていたが、中途からCPVT1(RYR2変異)のみでなく、CPVT2(CALM変異)患者にも対象を広げてT波の解析・比較を行った。CALM-QT延長症例に関してもT波形状の解析を進めて、先に「カルモジュリン変異を有する患者群」という形でまとめて、ヨーロッパ心臓病学会にて報告した。発表では、322例の小児致死性不整脈群の中で6つのCALM1-3変異を9名の患児に同定したこと、それらのカルモジュリン蛋白質内の局在について詳細に報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CPVT/CALM関連LQTSは重症度の高い遺伝性不整脈疾患であるが、その頻度が少ないこともあり、特にCPVTに対しての遺伝子検査が保険適応となっていないなど、医療における対応はまだまだ発展途上である。本研究を通して、国内におけるCPVT、CALM関連LQTSの病態についてより理解が進むことが期待される。特に、乳幼児期に致死性不整脈が多いという知見は重要なメッセージであり、これらのエビデンスを国内症例で蓄積することで、今後のCPVTに遺伝子検査保険適応導入などのアウトカムにつなげていけることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Initially, we planned to compare CPVT1 patients with QT prolongation with LQTS patients. However, because of the insufficient patient number, we extended our analysis to CPVT2(CALM) patients and CALM related LQTS patients. By the analysis of CALM-LQTS patients, we found 6 variants in 9 patients Among 322 children in calmodulin-encoded genes (2.8%) Their clinical diagnoses were LQTS (n=4), CPVT (n=3), and both (n=2). Their age of diagnosis ranges at 0-9 with the median of 5 years. There were three major clinical phenotypes; 1) CALM2-D96V, and E141K: two infants with advanced atrio-ventricular block, significant QTc prolongation, severe heart failure from their fetal period; both of them deceased within 1.5-year-old. Their phenotypes seemed to be mutation specific. Their cardiac features were severer, and the onset of LAEs was earlier compared with other genotypes of LQTS/CPVT.

We reported these findings in the scientific meeting, European Society of Cardiology 2022.

研究分野：Genetic arrhythmia

キーワード：RYR2 CALM CPVT LQTS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カテコラミン誘発性多形性心室頻拍 (CPVT) は、学童期を中心に、運動誘発性の心室頻拍から突然死を来す疾患である。運動負荷時には、特徴的な二方向性または多形性心室頻拍が心電図で記録される。CPVT の原因は、心筋内のカルシウムハンドリングを司る心臓リアノジン受容体 (RyR2) やカルシウムチャンネル、そしてカルモジュリンをコードする遺伝子の変異であることが知られている。その中でも最も多く見つかるのが RyR2 をコードする遺伝子、RyR2 の変異である。我々の研究施設では、20 年以上前から日本全国の遺伝性不整脈症例の集積および解析を継続しており、現在その登録数は 6200 例を超えている。その約 6% が CPVT 症例である。

一方、先天性 QT 延長症候群 (LQTS) も、CPVT と同様に健康な若年者の心臓突然死の原因となる重要な疾患であるが、心電図の特徴は QT 時間の延長であり、二方向性多形性心室頻拍心など、CPVT に特徴的な所見は認めない。LQTS の中でも 1 型 (LQT1) は、CPVT と同様、運動時に失神を来すことが多く、好発年齢も学童期であることから、CPVT との鑑別が困難なことがある。さらに鑑別が難しい理由として、「CPVT としての臨床病型を取り、心電図では QT 延長が記録され、遺伝子検索では RYR2 変異が同定される」症例が散見されることが挙げられる (図 1)。そのため我々は、LQTS の診断基準である Schwartz スコアを改訂し、LQT1 と CPVT の鑑別を可能にした論文を *Circulation Journal* 誌に報告している。(Ozawa J, Fujii Y, et al. *Circ J.* 2018 24;82:2269-2276.) この論文では、運動負荷後 4 分での QT 時間が、LQT1 では延長しているものの、CPVT では短縮しているため、両者の鑑別に有効である点を指摘した。しかし、安静時心電図の波形変化の特徴や、QT 延長が記録される誘導の局在は詳細に解析していない。また、QT 延長を来すリアノジン受容体の変異部位の特徴や機能変化についても解析できていない。そこで、我々は今回、これらの点について従前の研究をさらに発展させ、LQT1 と CPVT の鑑別をより正確に行うために本研究計画を立案した。そして本研究の学術的問いを、以下のように据えた。「臨床像と心電図波形の特徴から、LQT1 と CPVT を鑑別することができるのか。そして、QT 延長を来す RYR2 遺伝子変異の構造的・機能的特徴はどのようなものか。」

2. 研究の目的

本研究では、LQTS 患者と QT 延長を合併した CPVT 患者を比較検討し、両者の心電図的所見を含めた臨床像を明らかにする。さらに QT 延長を来す RYR2 変異の機能解析を行い、QT 延長に関するメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

ステップ① 心電図解析: 安静時心電図から RYR2 変異関連 QT 延長に特徴的な心電図所見を同定する。現在、我々の遺伝性不整脈データベースには、約 300 人の RYR2 遺伝子変異陽性患者が登録されている。この登録者のうち、QT 延長を呈している症例を抽出し、その特徴を古典的な QT 延長症候群の T 波の形状と比較する。RYR2 遺伝子変異陽性者の T 波の形状が、これらの 3 パターンに類似するか、または全く異なるかについて詳細に検討する。

ステップ② QT 延長関連遺伝子の SNP 解析: 次に、RYR2 変異関連 QT 延長症例において、QT 時間に影響を与えるような一塩基多型の合併がないかどうかについて解析を行う。既知の QT 延長関連遺伝子上には、それ単独では QT 延長症候群を引き起こさないが、心電図の QT 時間に影響を与える比較的頻度の多い一塩基多型が複数見つかった。こういった「弱い」多型が複数合わさることで、特定の患者に明らかな QT 延長をもたらすことは以前から知られている。我々

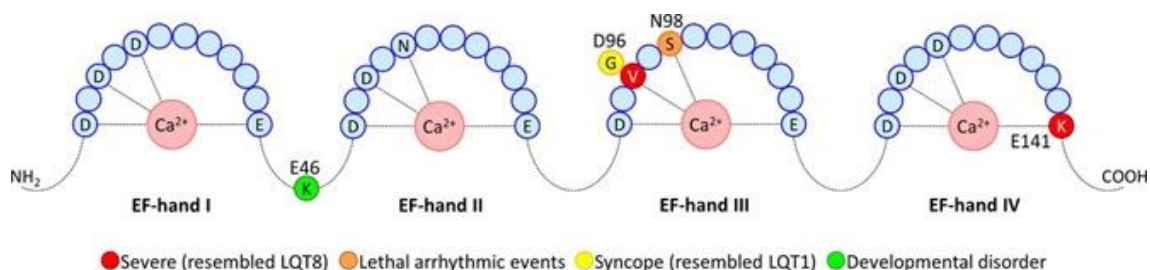
は、こういった一塩基多型が CPVT で QT の長い症例で多いのではないかと疑っている。そこで、それらの分布や頻度が、QT 延長をとまなわない CPVT 症例と QT 延長を伴う CPVT 症例 (RyR2 変異関連 QT 延長) の間で異なるかどうかについて次世代シーケンサーのパネル解析を用いて分析する。

ステップ③ 変異 RyR2 の構造的・機能的解析：まず、QT 延長を来す RyR2 変異と、QT 延長を生じない RyR2 変異を RyR2 の 3D モデル上に配置し、その構造的な特徴を比較検討する。低温電子顕微鏡を用いて作成されたオンラインアクセス可能な RyR2 の 3D モデルを用いて、QT 延長関連 RyR2 変異を他の RyR2 変異と比較し、変異が RyR2 の構造に与える異常について検討する。続いて、変異 RyR2 の機能解析を行い、QT 延長を伴う RyR2 変異の機能特性について評価を行う。機能解析は、QT 延長を呈する患者に同定された RyR2 変異(多数ある場合は 2 から 3 つ)を有するマウス由来 RyR2 を、Flp-In system (Life Technologies)にて HEK293 cell line に導入し、安定発現するように作成された培養細胞系を用いて行う。小胞体のカルシウムシグナリング測定のためのインジケター-R-CEPIA1er を上述の HEK293cell にトランスフェクションした後、細胞内カルシウムプローブ Fluo-4AM を培地に加えて細胞内へ Load し、細胞内カルシウムイオン濃度変化を測定する。

4. 研究成果

本研究では、LQTS 患者と QT 延長合併 CPVT 患者を比較し、両者の臨床像を明らかにすることと、一部の RyR2 変異が QT 延長を起こすメカニズムを解明することを目的としている。当初の計画では、RyR2 変異 QT 延長患者の T 波の形状や QT 間隔から患者をサブグループに分け、比較検討する予定であったが、予想以上に T 波形状がバリエーションに富んでおり、明確な基準を以てのグループ分けに難渋した。そこで、CPVT1(RyR2 変異)のみでなく、CPVT2(CALM 変異)患者にも解析対象を広げ、まずは T 波形状の解析・比較を行った。CALM-CPVT 症例の数は非常に限られていたが、CALM 変異は QT 延長症候群の原因遺伝子としても知られているため、CAM-LQTS 症例の心電図データについても比較・解析の対象に含めた。一方、同時に QT 延長症例に関しても同様の T 波形状の解析を進めて、「カルモジュリン変異を有する患者群」という形でまとめて、学会発表にて報告した (European Society of Cardiology 2022 ehac544.667, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac544.667>、第 68 回日本不整脈心電学会学術集会 下図)。

本発表では、322 例の小児致死性不整脈群の中で 6 つの CALM1-3 変異を 9 名の患児に同定している。図のようにそれら遺伝子変異の局在と不整脈の発症年齢 (0-9 歳、中央値 5 歳) について詳細に報告した。



RyR2 の遺伝子変異解析に関しては、リアノジン受容体上の局在から大きく 4 から 5 つに分け、

この局在に基づいて患者をサブグループに分類するプロセスが完了している。現在は機能解析を並行して実施中であるが、プラスミドの作成に難渋しており、予定よりも進捗は悪い。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 M Fukuyama, M Horie, K Kato, T Ozawa, Y Fujii, Y Okuyama, T Makiyama, S Ohno, Y Nakagawa
2. 発表標題 Calmodulinopathy is a common cause of critical cardiac phenotypes in fetus and infancy
3. 学会等名 ESC 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fukuyama M, Horie M, Kato K, Ozawa T, Fujii Y, Okuyama Y, Makiyama T, Ohno S, Nakagawa Y.
2. 発表標題 Fetal and Infant Lethal Ventricular Arrhythmias Are Common in Cardiac Calmodulinopathy.
3. 学会等名 第68回日本不整脈心電学会学術集会（2022.6.7-11. 横浜）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Okuyama Y, Ozawa T, Fujii Y, Kato K, Sugimoto Y, Nakagawa Y, Ashihara T.
2. 発表標題 Characteristics of spatial distribution of rotors in non-paroxysm atrial fibrillation patients refractory to pulmonary vein isolation: ExTRa Mapping project.
3. 学会等名 第68回日本不整脈心電学会学術集会（2022.6.7-11. 横浜）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	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
---------	---------