

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 18 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590871

研究課題名(和文) 心臓突然死の迅速な遺伝子診断法の開発：致死性不整脈原因遺伝子変異の探索のために

研究課題名(英文) Genetic diagnosis for cardiac sudden death: a search for mutations in genes associated with inherited lethal cardiac arrhythmias

研究代表者

松末 綾 (MATSUSUE, AYA)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：70309920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：器質的変化を認めない心臓突然死で死亡したと考えられる11剖検例より、遺伝性致死性不整脈の原因遺伝子であるSCN5A並びにRYR2遺伝子の変異を探索した。SCN5A遺伝子において、1193番目のアミノ酸であるArgがGlnに置換したヘテロ接合体変異が認められた(R1193Q)。RYR2遺伝子にアミノ酸置換を伴う変異は認められなかった。アジア人、ヨーロッパ人並びにアフリカ人集団におけるR1193Qの頻度調査をTaqMan法並びにAPLP法で行った。その結果、変異型alleleは、アジア人に特異的であり、他の集団では非常にまれな変異であると考えられ、アジアの南東部が起源であると推察された。

研究成果の概要(英文)：Mutations of the SCN5A and RYR2 genes were investigated in 11 forensic autopsy cases suspected of sudden cardiac death that revealed no organic changes. In the SCN5A gene, the subject was found to be heterozygous for an amino acid substitution in exon 20: G>A mutation causing a p.R1193Q substitution. In the RYR2 gene, there were no mutations that caused amino acid substitutions. We investigated the frequency of the p.R1193Q substitution in more than 4,000 genomic DNA samples from 34 Asian, European, and African populations using TaqMan and/or APLP assays. Allele A (p.R1193Q) was detected in most of the Asian populations, but was sporadically observed or absent in the European and African populations. The p.R1193Q substitution is characteristic of Asian populations and allele A must have originated in southern East Asia and then diffused into surrounding populations, flowing into Japan and Korea with fairly high frequencies.

研究分野：法医学

キーワード：心臓突然死 遺伝性致死性不整脈

## 1. 研究開始当初の背景

法医鑑定実務(剖検診断)において、死因となりうる疾病、病態を解明できず、心臓突然死としか考えられない症例は多く経験される。特に致死性不整脈で死亡した場合、病理組織学的に器質的变化を認めないため、死因の判定に苦慮する場合が多い。

近年、疾病と遺伝子変異との関連が研究され、数々の原因遺伝子が明らかにされている。遺伝性致死性不整脈についても原因遺伝子が明らかにされてきており、その変異が致死性不整脈を発症することが示唆され、患者を対象として遺伝子変異が検索されている。本研究は、法医剖検例における致死性不整脈の原因遺伝子変異を探索し、心臓突然死の診断に応用するという研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

器質的变化を認めない心臓突然死で死亡したと考えられる剖検例より、遺伝性致死性不整脈の主な原因遺伝子である *SCN5A* 並びに *RYR2* 遺伝子のエキソン領域の変異をダイレクトシーケンス法で特定する。

剖検例から検出された変異について、TaqMan 法並びに APLP (amplified product length polymorphism) 法で検討し、簡便な操作で迅速且つ高精度で変異を判定する方法を確立する。検出された変異が既報告の変異か否か、健常人にどの程度認められるかを明らかにする。検出された変異について、アジア人、ヨーロッパ人並びにアフリカ人集団における頻度を調べる。

## 3. 研究の方法

### (1) 心臓突然死剖検例における変異の探索

法医解剖した剖検例のうち、器質的变化を認めない心臓突然死症例を対象とした。剖検診断、免疫組織化学的検査並びに薬毒物分析の結果、心臓突然死症例と考えられた 11 剖検例について、*SCN5A* 遺伝子並びに *RYR2* 遺伝子の変異を探索した。遺伝性致死性不整脈の原因遺伝子の一つである *SCN5A* 遺伝子は 28 のエキソンからなっており、今回の解析では、*SCN5A* 遺伝子内のアミノ酸をコードしているエキソン 2 からエキソン 28 の塩基配列の解析を行った。*RYR2* 遺伝子は、高多型領域とされる、エキソン 8-15、44-47、49、83-105 の計 36 エキソンについて解析を行った。血液から常法に従って DNA を抽出し、それぞれのエキソンを増幅するようにプライマーを設計し、PCR で増幅後、増幅産物を精製し、ダイレクトシーケンス法で変異を探索した。

### (2) 遺伝性致死性不整脈の原因遺伝子の変異を検出する方法の確立

検出された変異について、シーケンスにより既に型が判明している検体を用いて、

TaqMan法並びにAPLP法でタイピングを行った。TaqMan法は、Custom TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assaysを使用し、7500 Real-Time PCR Systemで解析した。APLP法はPCR産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離して判定した。

### (3) 遺伝子変異の頻度調査

アジア人、ヨーロッパ人並びにアフリカ人集団、計34集団4044人において、検出された変異を解析し、頻度調査を行った。日本人[青森(100)、岩手(120)、山形(95)、新潟(100)、鳥取(103)、福岡(200)、宮崎(198)、鹿児島(202)、沖縄(196)、香取(84)、対馬(105)、五島(184)]、Korean[Seoul(108)、Kwangju(141)]、Oroqen(81)、Evenki(114)、Mongolia[Buryat(101)、Khalkha(100)]、Han Chinese[Beijing(118)、Gu'an(118)、Wuxi(119)、Xi'an(97)、Changsha(108)、Huizhou(108)、Kunming(83)]、Yunnan Minority(64)、Tibetan(98)、Thai(114)、Asian Indian(107)、Turk(112)、Germa[n] Munich(169)、Cologne(199)]、French(98)並びにAfrican(68)の血液から常法に従ってDNAを抽出し、変異の検出をTaqMan法並びにAPLP法で行った。

遺伝子頻度の算出やHardy-Weinberg(HW)平衡の検定はSNPAlyze Ver. 8を用いて行った。さらに、今回調べた34集団並びに既報告の14集団における変異型alleleの遺伝子頻度を基に、Surfer 12.0 programを使用してContour mapを作成した。

## 4. 研究成果

### (1) 心臓突然死剖検例における変異の探索

*SCN5A* 遺伝子の変異を探索した結果、心臓突然死で死亡した可能性のある剖検例において変異が認められた。その変異は、*SCN5A* 遺伝子のエキソン20のグアニンがアデニンへ変異したヘテロ接合体変異だった。この変異により、1193番目のアミノ酸であるArgがGlnに置換していた(R1193Q)。*RYR2* 遺伝子にアミノ酸置換を伴う変異は認められなかった。

*SCN5A* タンパクは、構造的に、大きく4つのドメインからなり、それぞれのドメインは6つのセグメント(S1~S6)で構成されている。今回、この症例に認められたR1193Qは、*SCN5A* タンパクの、ドメイン2とドメイン3をつなぐ細胞内ループの、ドメイン3の近くに存在する。この変異は、過去に、Brugada症候群とQT延長症候群の患者に認められており、*in vitro*の実験系でナトリウムチャネルの不活性化を促進することが報告されているが、R1193Qの影響については、未だ不明な点が多い。

### (2) 遺伝性致死性不整脈の原因遺伝子の変異を検出する方法の確立

*SCN5A* 遺伝子で認められたR1193Q変異について、TaqMan法とAPLP法で判定する方法を確立した。使用したプライマーとプローブを表1に示す。図1に示すように、

TaqMan 法と APLP 法を用いて genotype を迅速かつ明確に識別できた。シーケンスにより既に型が判明している検体を用いて、TaqMan 法と APLP 法でタイピングを行ったところ、シーケンスの結果と一致したため、正確な判定ができていると判断した。

表 1 *SCN5A* 遺伝子の R1193Q 判定に使用した TaqMan<sup>®</sup> プライマー並びにプローブ、APLP プライマーの配列

TaqMan <sup>®</sup>	
Primer (5'-3')	
Forward:	ACTCTCTCCCATAGGCTGTGT
Reverse:	AGCTGTGCTCCACGATGTG
Probe	
VIC-CTGGTGGCGGTTGC	(Allele G)
FAM-CTGGTGGCAGTTGC	(Allele A)
APLP	
Forward (Allele G): TAGCAGGTCTTGCGCtACC	
Forward (Allele A): ataGTAGCAGGTCTaGCGCAACT	
Reverse: GTGCaGTGGACACCACACA	

小文字はミスマッチ配列を示す

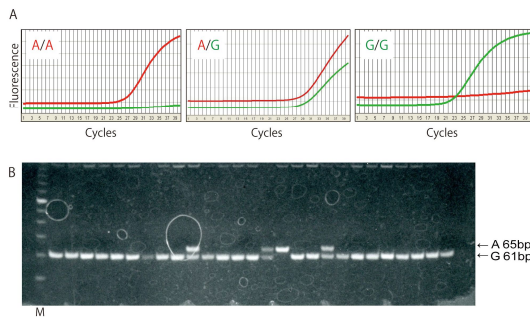


図 1 (A) TaqMan<sup>®</sup> 法による各遺伝子型での増幅曲線 Allele G 由来の VIC シグナルを緑で、allele A 由来の FAM シグナルを赤で示す。(B) APLP 法による増幅産物の泳動パターン Allele G の増幅産物は 61bp、allele A の増幅産物は 65bp。M; 10 bp ladder DNA marker。

### (3) 遺伝子変異の頻度調査

*SCN5A* 遺伝子について、アジア人、ヨーロッパ人並びにアフリカ人集団における R1193Q 変異を解析し、頻度調査を行った。今回調査した集団は、いずれも HW 平衡に合致した。図 2 に、今回調査した東アジアおよび南アジアにおける頻度分布を示す。

R1193Q の変異型 allele の頻度が最も高かったのは青森の 0.1000 であった。次に高いのは岩手の 0.0833 であった。他の日本人における変異型 allele の頻度は 0.0153 から 0.0750 であった。日本人集団において、変異型 allele の分布は均一ではなく ( $\chi^2=34.7, p<0.001$ )、青森、岩手、沖縄は日本人集団の平均値 (0.0521) から逸脱していた。今回調べた日本人集団における変異型 allele 頻度の平均値と、過去に報告された日本人の Brugada 症候群の患者群における頻度は同程度であった。Korean では、Seoul と Kwangju の頻度はそれぞれ 0.0278 と

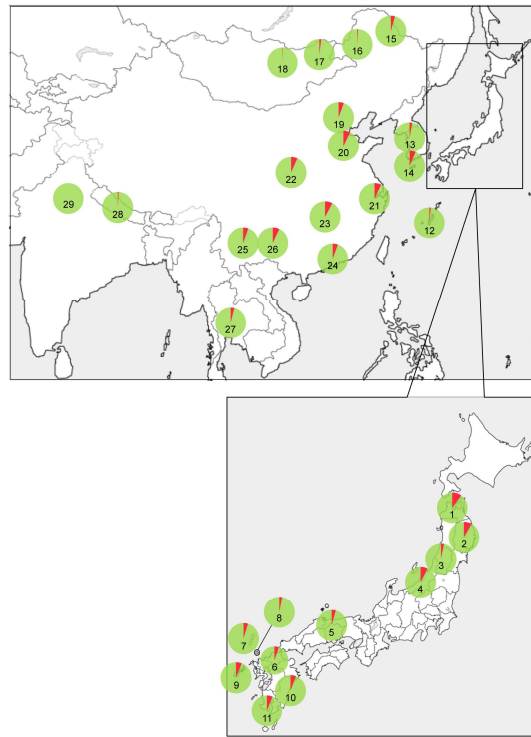


図 2 今回調査した東アジア及び南アジア集団における allele A (p.1193Q) の遺伝子頻度分布 Allele A の頻度を円グラフの赤で示す。

1: 青森, 2: 岩手, 3: 山形, 4: 新潟, 5: 鳥取, 6: 福岡, 7: 対馬, 8: 香岐, 9: 五島列島, 10: 宮崎, 11: 鹿児島, 12: 沖縄, 13: Seoul, 14: Kwangju, 15: Heihe (Oroqen), 16: Hailar (Evenki), 17: Dashbalbar (Buryat), 18: Ulaan Baator (Khalkha), 19: Beijing, 20: Gu'an, 21: Wuxi, 22: Xi'an, 23: Changsha, 24: Huizhou, 25: Kunming, 26: Yunnan, 27: Bangkok (Thai), 28: Kathmandu (Tibetan), 29: New Delhi (Asian Indian)。

0.0638 であった。東アジアの北部の Oroqen と Evenki では、それぞれ 0.0432 と 0.0088 であった。Mongolia では、Buryat で 0.0198 Khalkha で 0.0050 と頻度が低かった。Han Chinese における頻度は 0.046 から 0.0787 であった。Yunnan Minority は 0.0703 であった。Tibetan では 0.0102 と低く、Thai では 0.0395 であった。Turk は 0.0045 と低頻度であった。アジア人では、Asian Indian 以外の全ての集団で変異型 allele が観察された。アジア以外の地域では、German でわずかに変異型 allele が観察された (Munich で 0.0030、Cologne で 0.0025) が、French と African では認められなかった。1000 Genomes Project のデータによると、変異型 allele は Caucasians、Mexican Ancestry、Northern and Western European ancestry 並びに British に散発的に観察され (0.003-0.008)、アフリカや南ヨーロッパでは認められていない。以上の結果から、R1193Q はアジア人に特異的であり、他の集団では非常にまれな変異である可能性が考えられた。東アジアにおいて、変異型 allele の頻度と、緯度並びに経度との間に相関は認められなかった。

今回調査した 34 集団と既報告の 14 集団の

遺伝子頻度を基に作成した Contour map を図 3 に示す。

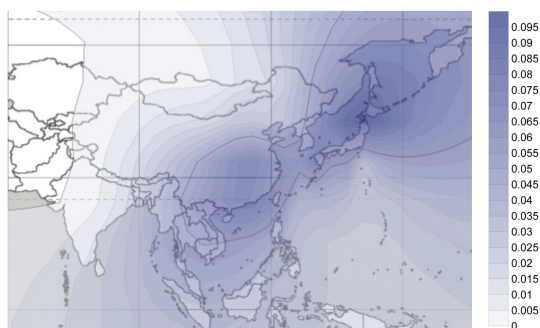


図 3 Allele A (p.R1193Q) の遺伝子頻度を基に作成した Contour map  
遺伝子頻度に対応するカラースケールを右に示す。黒のラインは遺伝子頻度が 0.045 のラインを示す。

変異型 allele の頻度が 0.045 のラインは中国の南東部から韓国の南部、日本(沖縄を除く)にかけて広がっている。東北より北部の頻度データがないため、日本以北の Contour ラインは不明であった。Han Chinese における頻度は 0.046 (Beijing) から 0.0787 (Changsha) であった。中国の周辺の地域 (Khalkha, Buryat, Tibetan 並びに Thai) では、Han Chinese より低い頻度 (0.0050 から 0.0395) を示した。ユーラシア大陸で一番高い頻度を示したのは、Changsha であった。これまで、アジアの南東部を起源とし、周辺に拡散したと考えられる変異は数多く報告されており、R1193Q の変異型 allele も同様と考えられた。変異型 allele はアジアの南東部が起源であり、その後周辺に拡散し、韓国や日本に高い頻度で流入したと推察され、その結果、中国の南東部から韓国の南部、日本にかけて、変異型 allele 頻度の高い地域が認められると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Matsusue A, Yuasa I, Umetsu K, Nakayashiki N, Dewa K, Nishimukai H, Kashiwagi M, Hara K, Waters B, Takayama M, Ikematsu N, Kubo SI. The global distribution of the p.R1193Q polymorphism in the SCN5A gene. Leg Med. 19, 2016, 72-76. 査読有  
DOI: 10.2152/jmi.63.114.

### 〔学会発表〕(計 6 件)

松末 綾, 湯浅 勲, 梅津 和夫, 中屋敷 徳, 出羽 厚二, 柏木 正之, 原 健二, Brian Waters, 高山 みお, 高本 睦夫, 久保 真一. アジア人, ドイツ人並びにアフリカ人集団における SCN5A 遺伝子 R1193Q 変異の頻度調査. 第 15 回日本法医学会学会学術北日本地方集会, 2014.10.31; アズ七日町 (山形市)  
Aya Matsusue, Isao Yuasa, Kazuo Umetsu,

Nori Nakayashiki, Masayuki Kashiwagi, Kenji Hara, Brian Waters, Mio Takayama, Shin-ichi Kubo. The frequencies of the R1193Q polymorphism in the SCN5A gene in Asian, German and African populations. 9th International Symposium on Advances in Legal Medicine (ISALM), 2014.6.18; Fukuoka.

Aya Matsusue, Isao Yuasa, Kazuo Umetsu, Masayuki Kashiwagi, Kenji Hara, Brian Waters, Mio Takayama, Shin-ichi Kubo. The frequencies of R1193Q polymorphism in the SCN5A gene in Japanese and German populations. 11th Indo Pacific Association of Law, Medicine and Science Congress (INPALMS), 2013.10; Kuala Lumpur.

松末 綾, 湯浅 勲, 梅津 和夫, 柏木 正之, 原 健二, Brian Waters, 高山 みお, 高本 睦夫, 久保 真一. 日本人並びにドイツ人における SCN5A 遺伝子 R1193Q 変異の頻度調査. 第 63 回日本法医学会学術九州地方集会, 2013.10.18; 九州大学 (福岡市)

松末 綾, 柏木 正之, 原 健二, Brian Waters, 高本 睦夫, 久保 真一. 成人及び乳幼児の突然死剖検例における遺伝性不整脈疾患の原因遺伝子変異の探索. 第 5 回福岡県医学会総会, 2013.2.3; 福岡県医師会館 (福岡市)

松末 綾, 柏木 正之, 原 健二, Brian Waters, 杉村 朋子, 高本 睦夫, 久保 真一. 心臓突然死剖検例における SCN5A 遺伝子の変異探索. 第 96 次日本法医学会総会, 2012.6.8; アクトシティ浜松 (浜松市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松末 綾 (MATSUSUE, aya)  
福岡大学・医学部・講師  
研究者番号: 70309920

### (2) 研究分担者

久保 真一 (KUBO, shinichi)  
福岡大学・医学部・教授  
研究者番号: 10205122

原 健二 (HARA, kenji)  
福岡大学・医学部・講師

研究者番号：00090738

柏木 正之 (KASHIWAGI, masayuki)  
福岡大学・医学部・准教授  
研究者番号：70301687

ウォーターズ ブライアン  
(WATERS, brian)  
福岡大学・医学部・助教  
研究者番号：00609480

(3)連携研究者  
なし