

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：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460648

研究課題名(和文) 心筋症における不整脈関連遺伝子の検索と機能解析および薬物的・非薬物的介入

研究課題名(英文) Searching and analysis of genes causing arrhythmia with pharmacological and non-pharmacological intervention

研究代表者

井野 秀一 (Ino, Hidekazu)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：20272966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：肥大型心筋症は若年者突然死の原因として最も頻度が高い。われわれの遺伝子解析研究の成果により、収縮不全の予測はある程度可能となった。しかしながら致死性不整脈については未だ予測は困難である。金沢大学を中心とした多施設研究で、遺伝子変異の存在がより多くの不整脈や心不全が発生することを確認した。遺伝子変異未検出の心筋症19例において、次世代シーケンサーを使用した網羅的遺伝子解析を行ない、新たな遺伝子変異を見出すことができた。心房細動の遺伝子解析および機能解析を行い、その変異の病原性をスコア化できるようになった。このアプローチにより肥大型心筋症の突然死予防をより確実に行うことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Hypertrophic cardiomyopathy(HCM) is one of the most frequent diseases causing sudden death especially in young people. We have found that part of the patients with this disease have gene mutations in heart muscle, causing heart function deteriorated, however, the relationship of gene mutation and sudden death mostly by fatal arrhythmia remained unresolved. Our institution-driven multicenter-prospective trial revealed the presence of gene mutation is associated closely with arrhythmia and heart failure in hypertrophied heart. We detected new mutation with comprehensive analysis using next generation sequencing system in familial HCM without mutation by previous method. . We also analyzed the gene mutations and those function in lone atrial fibrillation, and evaluated the arrhythmogenicity of the mutations by a scoring system. These approaches are anticipated to prevent the sudden death of hypertrophic cardiomyopathy.

研究分野：循環器内科(不整脈)

キーワード：肥大型心筋症 遺伝子解析 不整脈 突然死 非薬物治療

1. 研究開始当初の背景

高血圧など心臓に負担を強いる疾患がないにもかかわらず心臓肥大を呈する肥大型心筋症の約半数は心筋を構成する蛋白質の遺伝子異常によるとされる。心筋細胞自体が異常であり、有効な薬物治療は確率されていない。幼小児期より致死性不整脈による心臓突然死を発症し、若年者の突然死の原因としては最も頻度が高いにもかかわらず高危険群の同定すら困難である。研究代表者らは、これまで心筋症およびこれに関連する不整脈について遺伝子的側面から研究を行ってきた。

1990年に研究代表者はミトコンドリア遺伝子イソロイシントランスファーRNA(tRNA)遺伝子内 A4317G 点変異により乳児致死型心筋症が発症することを報告した (Mitochondrial mutation in fatal infantile cardiomyopathy. Tanaka M, Ino H, et al. Lancet 336 巻: 1452 頁. 1990 年)。

1991年にはロイシン tRNA(UUR) 遺伝子内 A3243G 点変異により乳酸アシドーシスと脳卒中様発作を伴ったミトコンドリア脳筋症 (mitochondrial myopathy, encephalopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes: MELAS) が発症することも報告した (Mitochondrial leucine tRNA mutation in a mitochondrial encephalomyopathy. Ino H, et al. Lancet 337 巻: 234-5 頁. 1991 年)。

1990年に肥大型心筋症の原因遺伝子変異が報告された後は、研究代表者らも心筋トロポニン I や T 遺伝子変異による肥大型心筋症の大家系を発見し、変異保因者は中年以降に左室収縮不全を合併した後に難治性心不全に陥りやすいことを報告した (Clinical features of hypertrophic cardiomyopathy caused by a Lys183 deletion mutation in the cardiac troponin I gene. Kokado H, Ino H, Fujino N, et al. Circulation 102 巻: 663-669 頁. 2000 年、Cardiac troponin T

Arg92Trp mutation and progression from hypertrophic to dilated cardiomyopathy. Fujino N, Ino H, et al. Clin Cardiol. 24 巻: 397-402 頁. 2001 年、A novel mutation Lys273Glu in the cardiac troponin T gene shows high degree of penetrance and transition from hypertrophic to dilated cardiomyopathy. Fujino N, Ino H, et al. Am J Cardiol. 89 巻: 29-33 頁. 2002 年)。

研究分担者の藤野は留学先の米国ハーバード大学医学部遺伝学部門サイドマン研究室にて、不整脈関連遺伝子のひとつである心筋リアノジン受容体遺伝子の変異が、肥大型心筋症患者の致死性不整脈発症を増悪させる修飾因子である可能性を示した。その後刺激伝導系障害を伴う心筋症の原因遺伝子を特定し、変異保因者に対して早期にペースメーカーまたは植込型除細動器 (ICD) 治療を行うことにより、突然死を予防できる可能性を示した (High incidence of sudden cardiac death with conduction disturbances and atrial cardiomyopathy caused by a nonsense mutation in the STA gene. Sakata K, Ino H, Fujino N, Hayashi K, et al. Circulation. 111 巻: 3352-3358 頁. 2005 年)。

さらに、心筋トロポニン遺伝子変異保因者が運動誘発性の心筋収縮不全をきたすことを心臓核医学検査により証明し、これが将来の心不全進展につながることを明らかにした。

研究分担者の林は QT 延長症候群を中心とする遺伝性不整脈疾患の遺伝子解析とその機能解析に従事し、QT 延長症候群の 11 種類の遺伝子変異、ブルガダ症候群の 2 種類の遺伝子変異、徐脈性不整脈の 1 種類の遺伝子変異に対してパッチクランプ法による機能解析を行い、学会報告や論文報告を行ってきた。このように多数の心筋症・不整脈患者において遺伝子型と臨床病型との関連を明らかにする過程で、肥大型心筋症患者の予後をさらに改善させるために、研究代表者らは「不整

脈による突然死の危険性」を予測し、高危険群の同定とこれに対する早期介入を行う体制を整えることが急務であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では研究代表者らがこれまでに集積した肥大型心筋症 400 家系について、肥大型心筋症の発症に第一義的に関与する心筋タンパク遺伝子解析を進め、不整脈関連遺伝子の重点的な解析を進め、致死性不整脈の発症を予測して早期加療に結びつけることとした。

3. 研究の方法

遺伝子解析の概要は以下のとおりとした。白血球より DNA extractor 341 Nucleic Acid Purification System (GENEPURE, PE Biosystems Corporation Ltd., Foster City, California) を用いて DNA を抽出し、PCR (polymerase chain reaction) 法にて遺伝子の増幅を行う。その後の手順として、従来からのポリアクリルアミドゲルでの電気泳動を用いた時間と手間のかかる Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) 法に替えて、平成 25 年からは高分解融解曲線分析 (Hi-Res Melting: HR-1) を用いて、ヘテロデュプレックスと野生型の融解曲線のわずかな違いを検出した。融解曲線の違いにより、遺伝子変異の存在が示唆された。専用のガラスキャピラリーで PCR を行い、このガラスキャピラリーを HR-1 の装置に入れるだけで、解析は可能であった (所要時間: 1 検体当たり 2~3 分)。スクリーニングの設定を HR-1 で確認した後に、多検体 (96 検体) 版装置: Light Scanner 装置を用いて、所要時間を 96 検体当たり 30 分程度に短縮して施行した。検出された遺伝子変異に対して、その変異を培養細胞に導入し、パッチクランプ法を用いて遺伝子変異が臨床病型を引き起こす機序を解明した。

4. 研究成果

(1) 心肥大症例の多施設共同コホート研究を遂行した。金沢大学を中心して、東京大学、国立循環器病研究センターを含む多施設で登録された 256 の左室肥大症例を、高血圧性心疾患群、サルコメア遺伝子変異を保有する肥大型心筋症群、高血圧やサルコメア遺伝子変異を伴わない肥大型心筋症群、の 3 群に分類して心血管イベントの出現について検討した。その結果、年齢と性別で補正すると、サルコメア遺伝子変異を保有する肥大型心筋症群は高血圧性心疾患群と比較して全心血管イベントの出現頻度が高いことが示された (図 1、B)。特に 50 歳以上の症例では、サルコメア遺伝子変異を保有する肥大型心筋症群は高血圧性心疾患群と比較して心不全による入院や心房細動をきたす頻度が高いことが示された (図 2、A と B)。

図 1. 年齢・性別補正後の全心血管イベントに関するコックス比例ハザード回帰解析

A) 全肥大型心筋症 (青線) と高血圧性心疾患 (緑線)、
(B) サルコメア遺伝子変異保有肥大型心筋症 (青線) と高血圧性心疾患 (緑線)、(C) 高血圧やサルコメア遺伝子変異を伴わない肥大型心筋症 (青線) と高血圧性心疾患 (緑線)

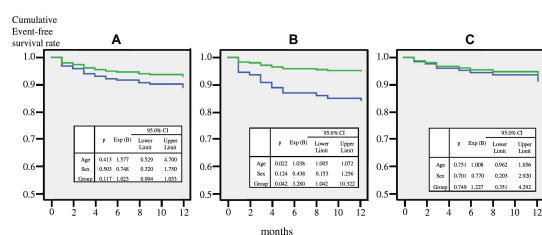
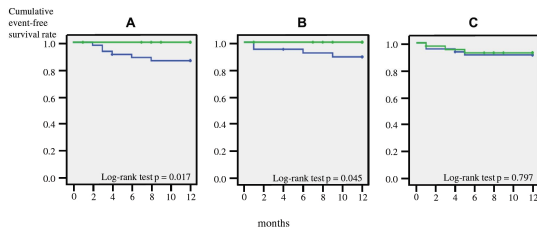


図 2. 50 歳以上の症例についての各心血管イベントに関する Kaplan-Meier 解析

(A) 心不全による入院、(B) 心房細動の出現、(C) 心室頻拍または心室細動の出現、サルコメア遺伝子変異保有肥大型心筋症 (青線)、高血圧性心疾患 (緑線)



(2) 次世代シーケンサーを用いた疾患原因変異解析は、これまでのように遺伝子の一部のみを増幅して変異を同定するのではなく、標的とする領域(今回は遺伝子の全エクソン領域)の変異を網羅的に、かつ高速に読み取ることが可能である。そのため、既知の疾患原因遺伝子対象とした変異解析に留まらず、新規の疾患原因遺伝子変異の検索・同定にも寄与することが期待されている。今回、研究代表者らは、これまで原因変異を同定できなかった肥大型心筋症1家系に対して、次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析を行い、肥大型心筋症の原因となる変異の同定を試みた。肥大型心筋症1家系7名に対して全エクソン解析を行い、同時にバイオインフォマティクス的手法を用いて原因変異の絞り込みを行った結果、MYL3(ミオシン必須軽鎖)遺伝子に原因変異を同定した(NM_000258.2:c.281G>A, p.Arg94His)(図3)。また、当研究室の心筋症レジストリを対象に同変異のスクリーニングを行った結果、同変異を有する肥大型心筋症1家系が追加で認められた。さらに、このMYL3 p.Arg94His変異を有する2家系の表現形を詳細に検討した。以上により、これまで原因となる遺伝子変異が同定されなかった肥大型心筋症家系において、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析が原因遺伝子変異の同定に有用である可能性が示唆された(図4)。

図3. 研究の対象となった肥大型心筋症2家系(HCM-F18, HCM-F189)の家系図

HCM-F18の7名に対して全エクソン解析を行い、原因変異(MYL3 p.Arg94His)を同定した。その結果をもとに同家系内の直接法による変異の検証、HCM-F189の同変異の検索、および変異近傍のコピー数変異(CNV)を用い

たハプロタイプ解析による検証を行った。

矢印は発端者、(+)は変異のキャリア、(-)はノンキャリアを示す。

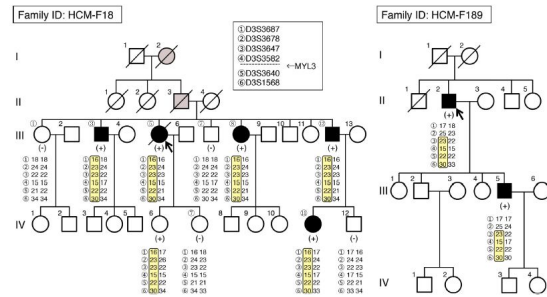
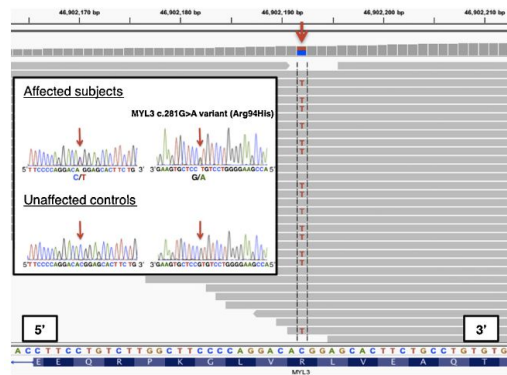


図4. 次世代シーケンサーを用いた原因変異の同定と、直接法による検証

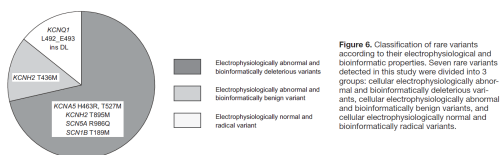
矢印が原因変異箇所(MYL3 c.281G>A, p.Arg94His)を示す。直接法による結果を併記する。



(3) 肥大型心筋症では心房細動が生じやすい。これは肥大心に伴い左心房に負荷が生じていると考えられるが、これも遺伝子変異により発症頻度が異なる。今回は孤立性心房細動90例中8例に心筋イオンチャネルの稀な遺伝子変異が認められ、その発症率は約9%であった。これらの変異は電気生理学的検討あるいは病理性予測ツールで異常が認められ、心房細動発症に関与している可能性があると考えられた。Combined Annotation Dependent Depletion (CADD)スコアは遺伝子変異の病原性評価に有用であった。電気生理学的検討で7種類中4種類の遺伝子変異が機能獲得性変異であることが明らかになり、これらの変異を持つ症例に対してはイオンチャネル阻害薬が有効である可能性が示唆された。また、心房細動未発症の若年の遺伝子変異保因者に対し、心房細動発症に関与する

危険因子の回避が必要と考えられた。(図5)

図5



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3件)

Nomura A, Tada H, Teramoto R, Konno T, Hodatsu A, Won HH, Kathiresan S, Ino H, Fujino N, Yamagishi M, Hayashi K. Whole exome sequencing combined with integrated variant annotation prediction identifies a causative myosin essential light chain variant in hypertrophic cardiomyopathy. J Cardiol. 査読有、2016;67:133-139. doi: 10.1016/j.jjcc.2015.09.003.

Hayashi K, Konno T, Tada H, Tani S, Liu L, Fujino N, Nohara A, Hodatsu A, Tsuda T, Tanaka Y, Kawashiri MA, Ino H, Makita N, Yamagishi M. Functional Characterization of Rare Variants Implicated in Susceptibility to Lone Atrial Fibrillation. Circ Arrhythm Electrophysiol. 査読有、2015;8:1095-1104. doi: 10.1161/CIRCEP.114.002519. Epub 2015 Jun 30.

Fujita T, Fujino N, Anan R, Tei C, Kubo T, Doi Y, Kinugawa S, Tsutsui H, Kobayashi S, Yano M, Asakura M, Kitakaze M, Komuro I, Konno T, Hayashi K, Kawashiri MA, Ino H, Yamagishi M. Sarcomere gene mutations are associated with increased

cardiovascular events in left ventricular hypertrophy: comparison with hypertensive heart disease. JACC Heart Fail. 査読有、2013;1:459-66. doi: 10.1016/j.jchf.2013.08.007. Epub 2013 Oct 24.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井野 秀一 (INO, Hidekazu)
金沢大学・医学系・協力研究員
研究者番号：20272966

(2) 研究分担者

藤野 陽 (FUJINO, Noboru)
金沢大学・保健学系・准教授
研究者番号：40361993

林 研至 (HAYASHI, Kenshi)
金沢大学・大学病院・助教
研究者番号：00422642