

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460670

研究課題名(和文) 遺伝性不整脈の新規原因遺伝子検索およびゼブラフィッシュを用いた不整脈重症度評価

研究課題名(英文) Genetic analysis for inherited arrhythmia and functional study using zebrafish model

研究代表者

林 研至 (Hayashi, Kenshi)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：00422642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：これまでサンガーシーケンスで遺伝子変異が認められなかった遺伝性不整脈症例に対して次世代シーケンサーを行い、遺伝子変異を検出した。検出した遺伝子変異のうち、イオンチャネル遺伝子変異についてパッチクランプ法による電気生理学的検討を行った。また、KCNH2遺伝子変異に対してゼブラフィッシュ初期胚を用いた疾患原因遺伝子の分子ノックダウン/レスキュー実験を行なった。さらに、家族性徐脈症例で見出されたLMNA遺伝子変異について、Crispr/Cas9システムを用いて遺伝子改変ゼブラフィッシュを作成し、その機能評価を行った。

研究成果の概要(英文)：We performed genetic analysis using next generation sequencing for patients with inherited arrhythmia. We performed electrophysiological study for detected gene mutations in ion channel genes using patch clamp methods. We evaluated mutations in KCNH2 gene using zebrafish embryo. Knockdown or CRISPR-mediated deletions of the human LMNA ortholog, Imna in zebrafish recapitulated the electrophysiological phenotypes of human early-onset bradycardia.

研究分野：循環器内科

キーワード：ゼブラフィッシュ 次世代シーケンス モルフォリノ Crispr/Cas9システム 遺伝子改変ゼブラフィッシュ

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝性不整脈には、先天性 QT 延長症候群 (LQTS)、ブルガダ症候群、カテコラミン誘発多形性心室頻拍、QT 短縮症候群、早期再分極症候群、家族性心房細動、家族性除脈、不整脈原性右室心筋症などが含まれる。遺伝性不整脈は比較的まれであるが、心臓突然死 (SCD) の原因として重要な疾患群である。2010 年の循環器学会ガイドラインによれば、植え込み型除細動器 (ICD) の適応となった重症不整脈の主な原因は心筋梗塞、拡張型心筋症、肥大型心筋症であるが、ブルガダ症候群、LQTS も併せて 2 割を占める。遺伝性不整脈における SCD は一般に若年から中高年層で発症することから、その病態を把握し、これを未然に防ぐことが特に重要である。過去 20 年間の分子遺伝学的研究の進歩により、多くの遺伝性心疾患が、細胞骨格タンパク、接着因子、イオンチャネルやその関連膜蛋白機能を司る各種遺伝子上の変異によって発症することが解明された。

当科ではこれまで 500 例を超える遺伝性不整脈症例を集積し、既知遺伝子の解析を行ってきた。臨床的に LQTS と診断された症例では 70%以上の確率で変異を同定できたが、それ以外の遺伝性不整脈疾患では、家族歴を認める症例であってもその検出頻度は 10-30%程度にすぎない。一方、近年の遺伝子解析技術の発展により、次世代シーケンサを用いて拡大候補遺伝子解析あるいは全エクソーム解析が可能となった。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々がこれまでに集積した遺伝性不整脈症例に対し、拡大候補遺伝子解析 (不整脈および心筋症に関与する 140 遺伝子の網羅的解析) あるいは全エクソーム解析を行い、その有用性を評価した (目的)。これらの解析により、従来の解析法で見逃されていた既知遺伝子変異、新規原因遺伝子および遺伝子変異が同定されると予想され、遺伝

性不整脈の病態解明に寄与すると考えられる。

次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析により、数多くの遺伝子多型が見出される。それらの多型が疾患発症にどの程度寄与しているかどうか明らかにすることは極めて重要である。本研究では、見出された遺伝子多型に対し、その稀少性の評価し、in silico の予測ツールを用いて病原性の評価を行った。さらに、家族解析による遺伝子型 - 表現型の決定、機能解析も行なった。本研究では特に機能解析に重点をおき、従来のパッチクランプ法に加え、ゼブラフィッシュを利用して遺伝子多型の病的意義の解明を試みた (目的)。(1) ゼブラフィッシュ初期胚を用いて疾患原因遺伝子の分子ノックダウン/レスキュー実験を行った。(2) Crispr/Cas9 システムを用いてゼブラフィッシュに遺伝子変異を導入し、受精後 48 時間での心拍数測定、心電図測定、心機能評価、刺激伝導速度測定などを行い、さらに遺伝子変異を有する成魚を作成した。従来のイオンチャネルレベルでの機能解析と比較し、個体レベルで解析することにより、遺伝子多型の病的意義および不整脈発生メカニズムをより正確に評価できると考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝性不整脈に対する網羅的遺伝子解析

関連病院と連携して集積した QT 延長症候群、Brugada 症候群、家族性徐脈、孤立性心房細動を含む約 500 例の遺伝性不整脈症例に対し、次世代シーケンサ - を用いて全エクソームシーケンシングを行い、未知の遺伝子変異を検索した。

### (2) 同定された遺伝子変異の機能解析

パッチクランプ法による機能評価  
イオンチャネル遺伝子変異が認められた場合、その遺伝子変異を動物培養細胞に導入し

て、遺伝子変異が臨床病型を引き起こすメカニズムを解明した。パッチクランプ法にて CHO-K1 細胞膜上に発現したイオンチャネルの電気生理学的な特徴を検討した。必要に応じてヒーターコントローラを用いてチャンパーを一定温度にして生理的に近い条件で電流測定を行った。

ゼブラフィッシュを用いた遺伝性不整脈の機能評価

-1 ゼブラフィッシュ初期胚を用いた心筋 K<sup>+</sup>チャネル遺伝子の分子ノックダウン/レスキュー実験

LQTS 症例で認められる遺伝子変異の 50% を占める KCNH2 遺伝子 (I<sub>Kr</sub>) 変異の病的意義について、ゼブラフィッシュ初期胚に KCNH2 のアンチセンスモルフォリノ単独、あるいは遺伝子変異を導入したヒト KCNH2 cRNA を同時に注入し 48 時間後に不整脈評価を行った。

アンチセンスモルフォリノ単独の場合、90%以上で房室ブロックあるいは心停止が生じる。一方、モルフォリノと野生型ヒト KCNH2 mRNA を同時に注入すると 60%以上が正常を示す。申請者らが見出した KCNH2 遺伝子変異種類の病的意義について、モルフォリノと変異 mRNA を同時に注入し、正常を示すゼブラフィッシュの割合の評価を行った。評価法として、まず光学顕微鏡 (Leica M205 FA, AF6000 システム) 下に心房と心室の拍動を観察して房室ブロックの有無、心停止の有無を評価した。また、ゼブラフィッシュの体表面心電図を測定し、不整脈、HR、PR、QRS、QT 等の評価を行った (図 4, PLOS ONE 2013; 8: e60552)。さらに、ゼブラフィッシュ初期胚より心臓をエンブロックに採取し、自己拍動している心臓に対してブリッジ記録で活動電位を記録し、活動電位の振幅、持続時間 (APD) を計測した。心筋活動電位は現有機器 (pCLAMP 9) で記録可能であった。

-2 遺伝子改変ゼブラフィッシュ作成と

機能評価および個別化医療の確立

LQTS、不整脈原性右室心筋症、先天性徐脈、家族性心房細動症例などの遺伝性不整脈症例より見出された病原性 protein truncating variants (PTV) を Crispr/Cas9 システムを用いてゼブラフィッシュに導入した。

sgRNA/Cas9 をゼブラフィッシュ胚の 1 cell stage にマイクロインジェクションし、2 日後に体細胞の挿入欠失変異の確認した。マイクロインジェクション後 2 ~ 3 日の時点で遺伝子変異の機能評価を行った。機能評価法として、光学顕微鏡下での心房・心室の拍動観察、ビデオマイクロスコープを用いた心機能評価評価、光学マッピングを用いた刺激伝導速度の測定、心電図測定、心筋活動電位測定を用いた。

#### 4. 研究成果

(1) 次世代シーケンサーを用いた遺伝性不整脈の遺伝子変異の検出

遺伝性不整脈 88 症例に対して次世代シーケンサーによる解析を行なった。LQT1-3 の遺伝子変異が認められなかった LQTS 31 症例のうち、17 例に遺伝子変異を見出した。また、若年発症徐脈 20 症例のうち、6 例に遺伝子変異を見出した (図 1)。

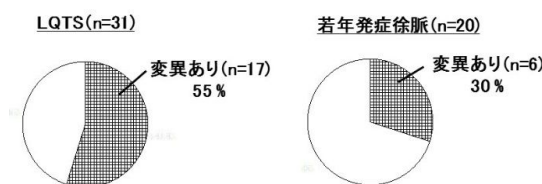


図1. 次世代シーケンサーによって明らかにされた遺伝子変異の割合

(2) パッチクランプ法による電気生理学的検討

イオンチャネル遺伝子変異の病的意義を明らかにするため細胞電気生理学的評価を行なった。LQTS 14 変異、孤立性心房細動 6 変異、若年発症徐脈 7 変異の機能評価を行った。機能異常の詳細を表 1 に示す。これらの

機能異常は、遺伝性不整脈の発症に寄与していると考えられる。

表1. 細胞電気生理学的検討結果

遺伝子	機能亢進	機能喪失
LQTS		
KCNQ1		4変異
KCNH2		10変異
孤立性心房細動		
KCNA5	1変異	1変異
KCNH2	2変異	
SCN5A		1変異
SCN1B	1変異	
若年発症徐脈		
KCNA5	1変異	
KCNH2		1変異
SCN5A		1変異
SCN10A	1変異	3変異

### (3) ゼブラフィッシュ初期胚を用いた疾患原因遺伝子の分子ノックダウン/レスキュー実験

ゼブラフィッシュ初期胚の体表面心電図測定、および心臓をエンブロックに採取して心筋活動電位を測定した(図2および3)。明確なP-QRS-T波を確認できる心電図を全体の30 - 40%で測定できた。

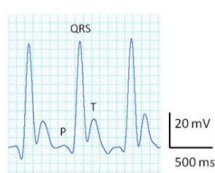


図2. ゼブラフィッシュ幼魚の代表的な心電図

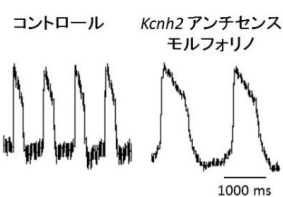


図3. ゼブラフィッシュ心筋細胞活動電位の代表的な心電図

次に、著明な QT 延長を認め、失神歴のある LQTS 症例(LQT2)で見出された心筋カリウムチャンネル変異遺伝子(KCNH2 E637K)のノックダウン/レスキュー実験を行った。ゼブラフィッシュ胚にゼブラフィッシュ *kcnh2* アンチセンスモルフォリノ (MO) 単独、MO + 野生型あるいは変異型 *KCNH2* cRNA を注入し、72 時間後に心電図を測定した。解析の結果、MO のみの QTc はコントロールと比較して有意に延

長し、MO + 野生型 *KCNH2* の QTc はコントロールと同程度であった。一方、MO + 変異 *KCNH2* の QTc はコントロールと比較して有意に延長した(図4)。なお、遺伝子変異部位により QTc の程度が異なっており、重症度の評価が可能と考えられた。また、MO を注入したゼブラフィッシュでは活動電位時間が有意に延長していた(図3)。

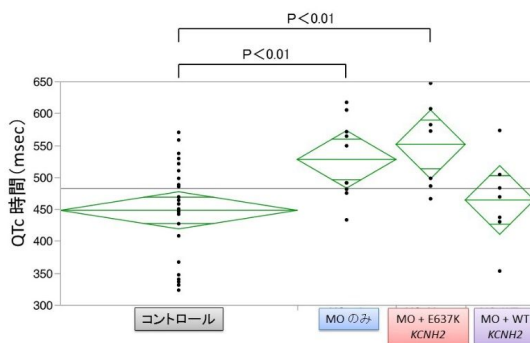


図4. ゼブラフィッシュ幼魚のQTc時間の比較  
MO, モルフォリノ; WT, 野生型

(4) Crispr/Cas9 システムを用いた遺伝子改変ゼブラフィッシュの作成および機能評価  
若年で徐脈を発症し、ペースメーカー移植術が行なわれた2症例より *LMNA* 遺伝子の2種類の protein truncating variant (PTV) を見出した。*LMNA* 遺伝子は非イオンチャンネル遺伝子であり、ゼブラフィッシュによる機能解析を試みた。Crispr/Cas9 システムを用いてヒト *LMNA* 遺伝子のホモログであるゼブラフィッシュ *lmna* 遺伝子に変異を導入し、心拍数、心機能、光学マッピングによる刺激伝導速度の評価を行なった。*lmna* 遺伝子変異をもつゼブラフィッシュでは心拍数の有意な低下および心室内伝導速度の有意な低下を認めた(図5,6)。また、心機能評価を行なったところ、変異を有するゼブラフィッシュにおいて左室駆出率および心拍出量の有意な低下を認めた。このように *LMNA* 遺伝子改変ゼブラフィッシュは、症例の臨床的特徴を忠実に再現していた。

また、若年発症徐脈1例より、未知の gene X の PTV を見出した。本遺伝子の病的意義を評価するため、gene X のホモログをノックダ

ウンしたところ、モルフォリノの用量依存的にゼブラフィッシュ胚の心拍数の低下を認めた(図7)。Gene XはTGF-シグナルを抑制するプロテインキナーゼをコードしており、本遺伝子と徐脈との関連性を明らかにするため検討を行なっている。このように、ゼブラフィッシュを用いることにより、機能不明の遺伝子と不整脈との関連性を推測することができると考えられた。

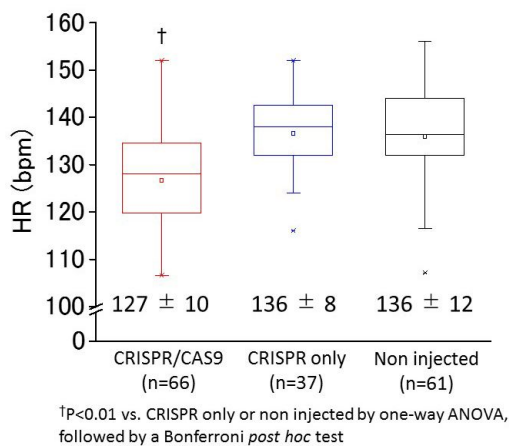


図5. *LMNA*遺伝子改変ゼブラフィッシュ胚の心拍数の比較

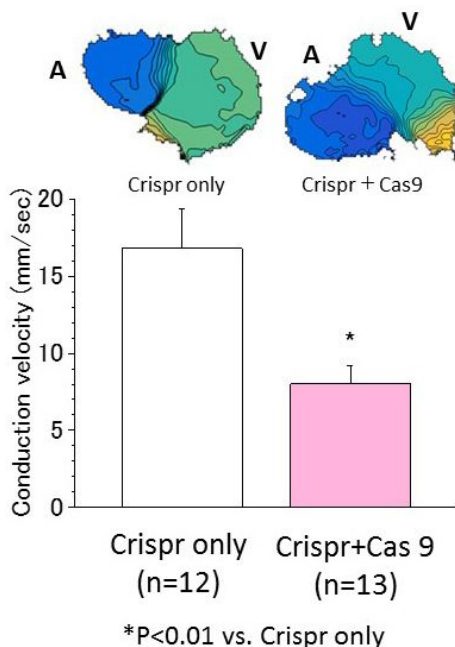
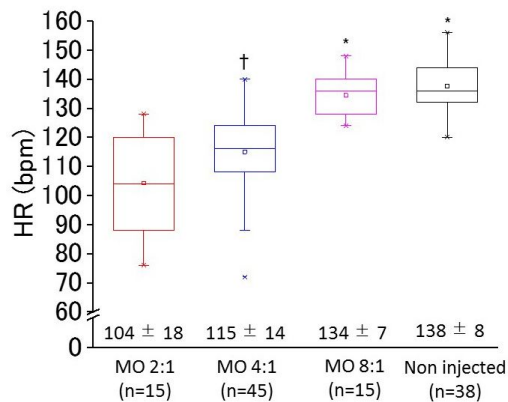


図6. *LMNA*遺伝子改変ゼブラフィッシュ胚の心室内伝導速度の比較



\*P<0.01 vs. MO4:1 or MO2:1 and †P<0.05 vs. MO 2:1 by one-way ANOVA, followed by a Bonferroni post hoc test

図7. Gene Xのモルフォリノノックダウンによるゼブラフィッシュ胚の心拍数の変化

## 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59件)

- Hayashi K, 他5名2番目: Dynamical mechanisms of phase-2 early afterdepolarizations in human ventricular myocytes: insights from bifurcation analyses of two mathematical models. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 査読有: Jan 1;312(1):H106-H127, 2017
- Hayashi K, 他21名18番目: Nakanishi C, Sakata K, Yamagishi M, Fukuda K. Emerin plays a crucial role in nuclear invagination and in the nuclear calcium transient. *Sci Rep*. 査読有: Mar 14;7:44312, 2017
- Hayashi K, 他2名1番目: The genetics of atrial fibrillation. *Curr Opin Cardiol*. 査読有: Jan;32(1):10-16, 2017.
- Hayashi K, 他14名1番目: Impact of Updated Diagnostic Criteria for Long QT Syndrome on Clinical Detection of Diseased Patients: Results from Study of Patients Carrying Gene Mutations. *JACC: Clinical Electrophysiology*. 査読有: 2(3):279-287, 2016
- Hayashi K, 他21名7番目: The genetics underlying acquired long QT syndrome:



impact for genetic screening. **Eur Heart J**. 査読有 : May 7;37(18):1456-64, 2016.

6. Hayashi K, 他 10 名 11 番目: 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 Feb;67(2):133-9, 2016.

7. Hayashi K, 他13 名 1 番目: Functional Characterization of Rare Variants Implicated in Susceptibility to Lone Atrial Fibrillation. **Circ Arrhythm Electrophysiol**. 2015 査読有 : 8(5):1095-104.

8. Hayashi K, 他8名3番目: Compound heterozygosity deteriorates phenotypes of hypertrophic cardiomyopathy with founder MYBPC3 mutation: evidence from patients and zebrafish models. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2014 査読有 : 307(11):H1594-604.

9. Hayashi K, 他5 名 2 番目: Current perspectives in genetic cardiovascular disorders: from basic to clinical aspects. **Heart Vessels**. 査読有 : 29(2):129-41, 2014.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Kenshi Hayashi, et al. Mechanisms of Fever-induced QT Prolongation in Patients with KCNH2 Mutations in the S5-pore Region: Evidence from Genotypic and Functional Analyses AHA2016 (New Orleans, LA, November 12-16, 2016)

2. Kenshi Hayashi, et al. Mechanisms of Fever-induced QT Prolongation in Patients with KCNH2 Mutations in the S5-pore Region ESC CONGRESS 2015, 2015 年 8 月 30 日 ロンドン イギリス

3. Hayashi K, et al. Functional Characterization of Rare Variants

Associated with Lone Atrial Fibrillation. ESC CONGRESS 2014, (September 02, 2014, Barcelona, Spain)

〔図書〕(計 1 件)

1. 林 研至 今野哲雄 川尻剛照 藤野陽 山岸正和 WPW 症候群における遺伝子異常の関与 ~ 遺伝子異常から副伝導路が? 遺伝性不整脈症候群 南江堂 178-181, 2015 年

〔産業財産権〕なし  
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

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

##### (2) 研究分担者

清水 渉 (SHIMIZU, Wataru)  
日本医科大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 50399606  
藤野 陽 (FUJINO, Noboru)  
金沢大学・保健学系・准教授  
研究者番号: 40361993  
宝達 明彦 (HODATSU, Akihiko)  
金沢大学・医学系・助教  
研究者番号: 00623662

##### (3) 連携研究者

関根 章博 (SEKINE, Akihiro)  
京都大学・医学系研究科・教授  
研究者番号: 30425631  
相庭 武司 (AIBA, Takeshi)  
独立行政法人国立循環器病研究センター・  
循環器内科・医長  
研究者番号: 40574348

##### (4) 研究協力者

津田 豊暢 (TSUDA, Toyonobu)  
田中 仁啓 (TANAKA, Yoshihiro)