

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860572

研究課題名(和文) 心筋サルコメアの遺伝子異常に起因する洞不全症候群の分子病態の解明

研究課題名(英文) Elucidation of genetic disorders and molecular pathogenesis in inherited bradyarrhythmia due to the abnormalities in genes encoding sarcomere components

研究代表者

石川 泰輔 (ISHIKAWA, Taisuke)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：60708692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：洞不全症候群などの上室性徐脈疾患は基礎心疾患により二次的に引き起こされることが多いが、一部には基礎心疾患なしに発症することがあり、遺伝子異常がその一因である。本研究ではいまだ変異の見つからない約2/3の家族性上室性徐脈疾患患者の原因遺伝子を明らかにするために、次世代シーケンサーを用いて網羅的遺伝子解析を行い、見つかった遺伝子変異についてはその疾患メカニズムを電気生理学的な手法や分子生物学的手法により決定した。本研究により、これまで原因不明であった約2/3の患者のうちの約4割(11名)の6遺伝子に遺伝子変異を同定した。中でも2つの原因遺伝子はこれまでに報告のない新規原因遺伝子であった。

研究成果の概要(英文)：The etiology of familial supraventricular bradyarrhythmia without basal heart disorders is partly due to genetic disorders. The aim of the study is to elucidate the responsible genes and mutations in the patients susceptible for genetic etiology. By using next generation sequencer to screen mutations for 200 genes that are preferentially expressed in the heart, we identified responsible genes and mutations in approximately 40% of cases (12 probands) with unknown etiology, including two novel responsible genes for sick sinus syndrome. In combination with the functional assay by using heterologous overexpression system, we determined 11 mutations in 6 genes as genetic disorders underlying familial supraventricular bradyarrhythmia.

研究分野：循環器遺伝学

キーワード：徐脈 不整脈 遺伝子 変異 遺伝子解析 心房 興奮伝導 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

近年の遺伝子解析技術の急速な発達と、遺伝学の進歩とともに、不整脈疾患においても遺伝子変異や遺伝子多型の関与が注目されている。洞不全症候群(Sick sinus syndrome; SSS)は一般に器質的心疾患に続発することが多いが、一部の家族性 SSS 患者では心筋 Na チャネル遺伝子 *SCN5A* やペースメーカーチャネル遺伝子 *HCN4*、膜裏打ちタンパク遺伝子 *ANK2* に変異を持つものの、いまだに多くの家系では変異が明らかでない。研究代表者は最近、心房ミオシン遺伝子 *MYH6* をはじめとするサルコメア遺伝子に変異を複数見つけている。近年遺伝学に大きな革新をもたらした次世代シーケンサー(NGS)による網羅的遺伝子解析は、サルコメアを含めた、新たな家族性 SSS 原因遺伝子群の同定とその機序のさらなる解明を進めることが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、①すでに日本人 SSS 患者に見つけている *MYH6* 遺伝子変異の分子病態を明らかにし、*MYH6* 変異を新規 SSS 原因遺伝子として確立することと、②NGS を用いて、いまだ原因の明らかでない日本人家族性 SSS 患者の原因遺伝子を同定し、その分子機序を明らかにすることである。

3. 研究の方法

① *MYH6* 変異の機能解析

MYH6 プラスミドを作成し、初代心筋細胞にトランスフェクションを行い、サルコメア構造の観察を行った。また *MYH6* の変異部位が結合する MYBPC3 タンパクのプラスミドを作成し、タンパク間結合能を評価した。また、組織レベルの観察として心房筋 HL-1 細胞の *MYH6* 安定発現細胞を得たのち、多電極シート MED64 基板上で興奮伝播を観察した。生体レベルの評価としてはゼブラフィッシュに *MYH6* モルフォリノをインジェクションし、*MYH6* が心調律に与える影響を観察した。

②-1 NGS を用いた網羅的遺伝子解析

原因不明の家族性 SSS 患者を対象に、心臓に強く発現する遺伝子をピックアップしたカスタムオリゴセットを作成し、それら遺伝子を網羅的に解析した。得られたデータは標準ヒトゲノムにマップしたのち、公共バリエーションデータベースを照合し、サンガーシーケンスののちに家族解析を行った。

②-2 分子生物学的手法を用いた機能解析

NGS で見いだされた原因変異候補はパッチクランプ法や共免疫沈降法、細胞免疫染色を用いて、分子病態評価を行った。

4. 研究成果

① *MYH6* 変異体は心筋細胞内でサルコメア構造を壊した。そのメカニズムとして、MYBPC3

との結合異常が関与する可能性が示唆された。また心拍に与える影響を観察するためにゼブラフィッシュに *MYH6* モルフォリノをインジェクションしてその機能を抑制したところ、心拍数が減少した。ここで野生型 *MYH6* を同時にインジェクションしておく心拍数は正常に復帰するが、変異体の *MYH6* をインジェクションすると心拍数は下がったままであり、*MYH6* 変異タンパクが心拍数において抑制的に働くことが分かった。

②-1 NGS を用いた遺伝子解析により、新規 SSS 遺伝子 2 つを含め、11 人の責任遺伝子を見つかることができた。これにより、51 名の SSS コホート集団の変異同定率は 34% から 55% に大きく上昇した。

②-2 新規原因遺伝子 X は細胞膜上に存在するイオンチャネルをコードする。このチャネルは他のイオンチャネルと同様に多量体を作るため、まず多量体形成能を免疫沈降法で検討したところ、結合能は変化していなかった。また細胞内局在を観察したところ変異体も野生型と同様に細胞膜上に存在したことから、この変異はイオンチャネル分子の局在や運搬には影響を及ぼさないものと思われた。

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 7 件)

1. Koizumi A, Ishikawa T, et al. (査読有、20 名中 6 番目) Genetic defects in a His-Purkinje system transcription factor, *IRX3*, cause lethal cardiac arrhythmias. *European Heart Journal*. 2016;In press.
2. Ishikawa T, et al. (査読有、3 名中 1 番目) Inherited bradyarrhythmia: A diverse genetic background. *J Arrhythmia*. 2016;In press.
3. Ishikawa T, et al. (査読有、11 名中 1 番目) A novel mutation in alpha-myosin heavy chain gene is associated with sick sinus syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2015;8:400-8.
4. Harrell DT, Ishikawa T, et al. (査読有、14 名中 3 番目) Genotype-dependent differences in age of manifestation and

arrhythmia complications in short QT syndrome. *Int J Cardiol.* 2015;190:393-402.

5. Tsuji Y, Ishikawa T, et al. (査読有、3名中2番目) Molecular mechanisms of heart failure progression associated with implantable cardioverter-defibrillator shocks for ventricular tachyarrhythmias. *J Arrhythmia.* 2014;30:235-241.
6. Makita N, Ishikawa T, et al. (査読有、39名中9番目) Novel Calmodulin (CALM2) Mutations Associated with Congenital Arrhythmia Susceptibility. *Circ Cardiovasc Genet.* 2014;7:466-474.
7. Abe K, Ishikawa T, et al. (査読有、19名中11番目) Sodium channelopathy underlying familial sick sinus syndrome with early onset and predominantly male characteristics. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2014;7:511-7.

[学会発表] (計 17 件)

1. Nishii A, Ishikawa T, et al. Conditional knockout mice recapitulated two families with congenital AV block and sick sinus syndrome with a novel connexin 45 mutation. 第 80 回日本循環器学会学術集会. 2016 年 3 月 18 日 仙台市民会館 (宮城県・仙台市)
2. Ishikawa T, et al. Dose-Sensitive Relationship of an SCN10A Pore Mutation and Enhancer SNPs Identified in a Brugada Syndrome Family with Different Expressivity. 第 80 回日本循環器学会学術集会. 2016 年 3 月 18 日 仙台市民会館 (宮城県・仙台市)
3. 大崎琢弥, 石川泰輔. 乳幼児突然死症例に対する次世代シーケンサーを用い

た脂肪酸代謝異常の遺伝子解析. 日本法医学会学術九州地方集会. 2015 年 10 月 16 日. 宮崎大学 (宮崎県・宮崎市)

4. 石川泰輔. 家族性心臓伝導障害に同定されたコネキシン遺伝子変異とその機能異常. 心血管膜輸送研究会 2015. 2015 年 10 月 30 日 生理学研究所 (愛知県・岡崎市)
5. 石川泰輔. 重症不整脈を伴う QT 延長症候群の新規原因遺伝子 CALM2 の同定. 第 66 回西日本生理学会. 2015 年 10 月 10 日 久留米大学 (福岡県・久留米市)
6. Tsuji Y, Ishikawa T, et al. Translational Perspective on Pathophysiology of Frequent ICD-shocked Ventricular Tachyarrhythmias. *The 32nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Society of Electrocardiology.* 2015 年 7 月 31 日 京都国際会議場 (京都府・京都市)
7. Makita N, Ishikawa T, et al. Emerging link between genetic variations of sodium channels and susceptibility to lethal arrhythmias. 第 88 回日本薬理学会. 2015 年 3 月 19 日 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)
8. Ishikawa T, et al. Dose-Sensitive Relationship of an SCN10A Pore Mutation and Enhancer SNPs Identified in a Brugada Syndrome Family with Different Expressivity. *The 32nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Society of Electrocardiology.* 2015 年 7 月 31 日 京都国際会議場 (京都府・京都市)
9. Ishikawa T, et al. Dose-Sensitive Relationship of an SCN10A Pore Mutation and Enhancer SNPs Identified in a Brugada Syndrome

- Family with Different Expressivity. *Heart Rhythm 2015*. 2015年5月15日 Boston (USA)
10. Ishikawa T, et al. A Novel Splicing Mutation in a Sarcomeric Gene MYPN Responsible for Familial Sick Sinus Syndrome Identified by Whole Exome Sequencing *The 79th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society*. 2015年4月25日. 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)
 11. Harrell DT, Ishikawa T, et al. Meta-analysis of Short QT Syndrome discloses genotype-dependent clinical characteristics in age of manifestation and arrhythmia. *The 32nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Society of Electrocardiology*. 2015年7月31日 京都国際会議場 (京都府・京都市)
 12. Harrell D Ishikawa T, et al. Distinct Clinical Characteristics in Short QT Syndrome Associated with Mutations in KCNH2 and KCNQ1. *The 79th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society*. 2015年4月25日. 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)
 13. Tsuji Y, Ishikawa T, et al. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent Protein Kinase II in Atrial and Ventricular Remodeling and Arrhythmias. *The 29th Annual Meeting of The Japanese Heart Rhythm Society*. 2014年7月24日 ザ・プリンスパークタワー東京 (東京都・港区)
 14. Tsuji Y, Ishikawa T, et al. Electrical Storm in Inherited Arrhythmia Syndrome. *The 31st Annual Scientific Meeting of the Japanese Society of Electrocardiology*. 2014年7月24日 ザ・プリンスパークタワー東京 (東京都・港区)
 15. Ishikawa T, et al. A Novel Mutation in Atrial Myosin Heavy Chain Coding Gene *MYH6* Causes Sick Sinus Syndrome. *The 29th Annual Meeting of The Japanese Heart Rhythm Society*. 2014年7月24日 ザ・プリンスパークタワー東京 (東京都・港区)
 16. Ishikawa T, et al. A novel cardiac alpha-myosin heavy chain (*MYH6*) mutation impairing sarcomere structure responsible for familial sick sinus syndrome *European Society of Cardiology 2014*. 2014年8月31日. Barcelona (Spain)
 17. Ishikawa T, et al. A Novel Cardiac α -Myosin Heavy Chain (*MYH6*) Mutation Associated with Familial Sick Sinus Syndrome Altering Sarcomeric Organization *Heart Rhythm 2014*. 2014年5月8日 San Francisco (USA)
- [図書] (計2件)
1. 石川泰輔. 徐脈性疾患と分子遺伝学. *循環器内科*. 2015;77:360-365.
 2. 石川泰輔. Brugada 症候群の遺伝子診断～有効性と限界～. *不整脈症候群－遺伝子変異から不整脈治療を捉える－*. 2015:82-85.
- [産業財産権]
- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)
- [その他]
- なし
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
- 石川 泰輔 (ISHIKAWA, Taisuke)
- 長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)

・助教
研究者番号：60708692

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし