

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22136007

研究課題名(和文)心臓イオンチャネルの遺伝子異常と機能破綻の分子基盤

研究課題名(英文)Genetic and functional basis of cardiac ion channelopathy

研究代表者

蒔田 直昌(MAKITA, Naomasa)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：00312356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 48,200,000円

研究成果の概要(和文)：家族性洞不全症候群(SSS)に、心房型ミオシン重鎖MYH6が関与していることが明らかとなった。本研究の目的は、新規MYH6変異(delE933)の機能解析を行うことである。免疫沈降実験から、delE933はミオシン結合タンパクCとの結合異常を介してサルコメア構造の機能連関を乱すこと、myh6ノックダウンゼブラフィッシュは徐脈をきたすこと、これを野生型MYH6は補償できるが変異MYH6にはその効果がなかった。また、delE933を安定発現させたHL-1では活動電位伝導速度が低下した。以上から、洞結節のexit blockによってSSSを発症する新しい機序が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Recent genome-wide association studies have demonstrated an association between MYH6, the gene encoding β -myosin heavy chain (β -MHC), and sinus node function in the general population. We identified an in-frame 3-bp deletion predicted to delete one residue (delE933) at the highly conserved coiled-coil structure within the binding motif to myosin-binding protein C (MyBP-C) in one patient. Co-immunoprecipitation analysis revealed sarcomere impairments. The HL-1 stably expressing delE933 showed slower conduction velocity on than wild-type. Furthermore, targeted knock-down of MYH6 in zebrafish significantly reduced the heart rate, which was rescued by co-expressed wild-type β -MHC but not by delE933. The novel MYH6 mutation delE933 causes both structural damage of the sarcomere and functional impairments on atrial action propagation. This report reinforces the relevance of MYH6 for sinus node function and identifies a novel pathophysiology underlying familial SSS

研究分野：循環器内科学

キーワード：洞不全症候群 MYH6 ミオシン重鎖 遺伝性不整脈

1. 研究開始当初の背景

洞不全症候群(sick sinus syndrome; SSS)は一般に器質的心疾患や加齢に伴って発症する、比較的頻度の高い上室性不整脈疾患である。しかし一部の患者では、家族内発症や若年発症が見られ、その病態に遺伝子異常の関与が示唆されている。これまで候補遺伝子解析によって、心筋 Na チャネル (*SCN5A*) やペースメーカーチャネル (*HCN4*)などが原因遺伝子として同定された。また、最近のゲノムワイド関連解析 (GWAS)から、心房型 ミオシン重鎖遺伝子 *MYH6* が SSS の疾患感受性遺伝子であることが解明された。この結果を基に我々は日本人 SSS 患者 1 名に新規欠損変異を見出した。しかしサルコメア関連遺伝子が洞機能不全をもたらすメカニズムは不明である。また *SCN5A*・*HCN4*・*MYH6* などの変異が見つからない家族性 SSS 症例はいまだ多く、次世代シーケンサーを使った網羅的遺伝子解析によって、未知の原因遺伝子変異と疾患メカニズムが提起されることが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1)日本人 SSS に同定した新規 *MYH6* 変異の機能解析を行うこと、2)家族性 SSS の網羅的遺伝子解析によって新規分子病態を探索することである。

3. 研究の方法

MYH6 変異が心拍数に与える影響は、ゼブラフィッシュを用いて解析した。ゼブラフィッシュの内因性 *myh6* をノックダウンするために開始コドンを選択したモルフオリノ (*MYH6*-ATG-MO) を作成し、*MYH6*-ATG-MO 単独、またはヒト野生型・変異 *MYH6* RNA とともにゼブラフィッシュ受精卵に注入し、48 時間後に孵化後の心拍数を測定した。

MYH6 変異が心房筋の伝導速度に与える影響をみるために、マウス心房筋細胞

HL-1 へ *MYH6* プラスミドを遺伝子導入し、G418 耐性安定発現細胞を得、それを 64 点多電極アレイ上に撒き、電気刺激の伝導速度を検討した。

また、家族性 SSS の網羅的遺伝子解析は、インフォームドコンセントの得られた家族性 SSS 発端者 30 症例を対象に、末梢血ゲノム DNA を抽出し、心機能・心疾患関連 459 遺伝子の全エクソンを濃縮するカスタム遺伝子パネルを作成し、次世代シーケンサーを用いて網羅的にシーケンス解析を行った。十分な depth と coverage を持った有効なシーケンスであったことを確認したのち、日本人多型データベースなどに登録のあるバリエーションを除外し、サンガー法を用いて確認を行った。また家族例については同様にサンガー法でシーケンスを行い、家系内集積が確認されたものを新規変異とした。

4. 研究成果

1. *MYH6* 変異と機能異常

最近の GWAS から、*MYH6* の多型が安静時心拍数や SSS の発症の危険性と関連することが明らかにされている。これらの知見を基に、家族性 SSS 患者の中に *MYH6* 変異キャリアがいると推測し候補遺伝子検索を行ったところ、ペースメーカーを植え込んだ 62 歳女性の SSS 発端者に、in-frame 3塩基欠損変異 (delE933) を同定した(論文 1)。サルコメアの構造機能調節に必須のミオシン結合タンパク C (MyBP-C) との免疫沈降実験から、*MYH6*-delE933 は MyBP-C との機能的結合を修飾すること、*MYH6*-delE933 を過剰発現させた新生児ラット心筋細胞ではサルコメア構造が破壊されたことから、心筋細胞のサルコメア構造の機能連関を乱すことが *MYH6* 変異の SSS 発症メカニズムであると推測した。

この *MYH6* 変異が洞機能を傷害することを *in vivo* で確認するため、ゼブラフィッシュに

内因性 $myh6$ のノックダウン単独、または野生型・変異ヒト $MYH6$ の過剰発現との組み合わせを行い、48時間後に個体の心拍数をした。 $myh6$ のノックダウン単独では徐脈が確認されたが、野生型ヒト $MYH6$ を過剰発現させた個体では $myh6$ が補償され、無処置の個体と同等の心拍数を示した。しかし変異ヒト $MYH6$ の過剰発現は $myh6$ の補償効果はなく、無処置の個体よりも有意に脈拍数は少なかった。以上の $in vivo$ データから、 $MYH6$ 欠失変異 $delE933$ は心拍数に関して機能喪失型変異であることが明らかになった。

次に、 $delE933$ が心房筋の電気生理学的特性に与える影響を調べるために、ヒト $MYH6$ の安定発現HL-1細胞を64点電極上にシート状に培養し、細胞間刺激伝導に与える影響を観察した。その結果、 $delE933$ - $MYH6$ を発現したHL-1細胞では刺激伝導速度が有意に低下していることが分かった。洞房結節の中心部にはサルコメアがあまり存在しないことを考え合わせると、 $MYH6$ 変異は洞房結節周囲の心筋サルコメアに構造異常をおこし、洞結節からの活動電位が周囲に伝播されるのを機能的にブロックする (exit block) と推測された。

2. 原因が未解明の家族性SSS症例に対する網羅的遺伝子スクリーニング

これまでの候補遺伝子解析で変異が見つからない日本人SSS患者30名に対して、459個の心疾患関連遺伝子の網羅的変異検索を行った。既知遺伝子である $HCN4$ (1例)、 $MYH6$ (2例)以外に、新規原因遺伝子X(1例)と転写因子 $TBX5$ (2例)に変異を同定した (未発表)。遺伝子Xの変異が同定された家系は、3世代に渡る濃厚な家族性SSSで罹患者を持つ家系だった。Xは洞房結節や房室結節に発現し、心筋細胞間刺激伝播に関与するタンパクをコードすることから、その機能喪失型変異はSSSを説明するものであると思われた。また今回変異を見出したアミノ酸

部位は、この遺伝子ファミリーを通じて保存されたアミノ酸部位であり、既にファミリー内の他の分子の結晶構造解析から、この部位がXタンパクの機能に重要な部位であることが判明している。遺伝子X変異は既知の原因遺伝子である $SCN5A$ などとは生理学的役割が異なることから、新たな家族性SSSの病態メカニズムを提起しうる技術としての次世代シーケンサーの有効性が示された。

本研究により、サルコメア構造を傷害する $MYH6$ 遺伝子変異が心房筋の電気伝導特性を変化させることがSSS発症基盤であると推測された。 $MYH6$ は心房中隔欠損の原因遺伝子としても知られており、その変異体は今回の欠失変異と同様に心筋サルコメアを破壊することが報告されていることから、サルコメアの形成維持異常という一つの細胞表現型が心臓の発生異常と刺激伝導異常という2つの異なる疾患表現型に結びつくかも知れない。今後も $MYH6$ 変異例の集積を継続し、発生異常と刺激伝導異常の関係について検討を行いたい。

心機能・心疾患関連459遺伝子を対象とした網羅的遺伝子スクリーニングにより新規原因遺伝子Xを見出すことができ、新たなSSS分子病態を提示する機会を得た。しかし、今回のスクリーニングでも原因遺伝子を断定できない例が多く存在することも確認された。これらの例では、対象とした459遺伝子以外に異常があることも考えられるが、現在までに得ているシーケンスデータの中に異常があるかも知れない。しかし生物学的な意義や知見が乏しいものが多く、完全に病因因子として焦点を当てるには至っていない。このような例に対しては生物学的知見の集積と同時に、より多くの患者を集め、遺伝子解析を実施することによって、疾患発症における負荷因子となっているか検証する必要がある。

SSSの新たな分子基盤として、*MYH6*変異による心房筋サルコメアの破壊が心房筋電気伝導速度を変えることを見出した。また新たな原因遺伝子Xを見出すことができ、網羅的遺伝子スクリーニングの有効性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Ishikawa T, Jou CJ, Nogami A, Kowase S, Arrington CB, Barnett SM, Harrell DT, Arimura T, Tsuji Y, Kimura A, Makita N. A novel mutation in the α -myosin heavy chain gene is associated with sick sinus syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 査読有、in press.
2. Abe K, Machida T, Sumitomo N, Yamamoto H, Ohkubo K, Watanabe I, Makiyama T, Fukae S, Kohno M, Harrell DT, Ishikawa T, Tsuji Y, Nogami A, Watabe T, Oginosawa Y, Abe H, Maemura K, Motomura H, Makita N. Sodium channelopathy underlying familial sick sinus syndrome with early onset and predominantly male characteristics. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 査読有、7 巻、2014、511-517
DOI: 10.1161/CIRCEP.113.001340
3. Makita N, Yagihara N, Crotti L, Johnson CN, Beckmann BM, Shigemizu D, Lichtner P, Ishikawa T, Aiba T, Homfray T, Behr ER, Klug D, Denjoy I, Mastantuono E, Theisen D, Tsunoda T, Satake W, Toda T, Nakagawa H, Tsuji Y, Tsuchiya T, Yamamoto H, Miyamoto Y, Endo N, Kimura A, Ozaki K, Motomura H, Suda K, Tanaka T, Schwartz PJ, Meitinger T, Käb S, Guicheney P, Bhuiyan ZA, Shimizu W, Watanabe H, Chazin WJ, George AL Jr. Novel calmodulin (*CALM2*) mutations associated with congenital arrhythmia susceptibility. *Circ Cardiovasc Genet*, 査読有、7 巻、2014、466-474
DOI:10.1161/CIRCGENETICS.113.000459
4. Ohno S, Omura M, Kawamura M, Kimura H, Itoh H, Makiyama T, Ushinohama H, Makita N, Horie M. Exon 3 deletion of *RYR2* encoding cardiac ryanodine receptor is associated with left ventricular non-compaction. *Europace*. 査読有、16 巻、2014、1646-1654
DOI: 10.1093/europace/eut382
5. Katsuumi G, Shimizu W, Watanabe H, Noda T, Nogami A, Ohkubo K, Makiyama T, Takehara N, Kawamura Y, Hosaka Y, Sato M, Fukae S, Chinushi M, Oda H, Okabe M, Kimura A, Maemura K, Watanabe I, Kamakura S, Horie M, Aizawa Y, Makita N, Minamino T. Efficacy of bepridil to prevent ventricular fibrillation in severe form of early repolarization syndrome. *Int J Cardiol*. 査読有、172 巻、2014、519-522
DOI: 10.1016/j.ijcard.2014.01.036
6. Yoshida M, Ando S, Chishaki A, Makita N, Hasegawa Y, Narita S, Momii H, Kadokami T. Normal dose of pilsicainide showed marked negative inotropic effects in a patient who had no underlying heart disease. *J Arrhythmia*、査読有、30 巻、2014、68-70
7. Hasegawa K, Ohno S, Itoh H, Makiyama T, Aiba T, Nakano Y, Shimizu W, Matsuura H, Makita N, Horie M. A rare KCNE1 polymorphism, D85N, as a genetic modifier of long QT syndrome. *J Arrhythmia*, 査読有、30 巻、2014、161-166
DOI: 10.1016/j.joa.2013.08.004

8. Kusumoto S, Kawano H, Makita N, Ichimaru S, Kaku T, Haruta D, Hida A, Sera N, Imaizumi M, Nakashima E, Maemura K, Akahoshi M. Right bundle branch block without overt heart disease predicts higher risk of pacemaker implantation: The study of atomic-bomb survivors. *Int J Cardiol*, 査読有、174 巻、2014、 77-82
DOI: 10.1016/j.ijcard.2014.03.152
 9. Abe Y, Sumitomo N, Okuma H, Nakamura T, Fukuhara J, Ichikawa R, Matsumura M, Miyashita M, Kamiyama H, Ayusawa M, Watanabe M, Joo K, Makita N, Horie M. Successful control of life-threatening polymorphic ventricular tachycardia by radiofrequency catheter ablation in an infant. *Heart Vessels*. 査読有、 29 巻、 2014、 422-426
DOI : 10.1007/s00380-013-0390-6
 10. Tsuji Y, Ishikawa T, Makita N. Molecular mechanisms of heart failure progression associated with implantable cardioverter-defibrillator shocks for ventricular tachyarrhythmias. *J Arrhythmia*, 査読有、 30 巻、 2014、 235-241
DOI: 10.1016/j.joa.2014.04.003
- 〔学会発表〕(計 16 件)
1. Makita N, Ishikawa T, Schott JJ, Bezzina CR. Emerging link between genetic variations of sodium channels and susceptibility to lethal arrhythmias. 第 88 回日本薬理学会 . 2015/03/19、 名古屋市、 名古屋国際会議場
 2. Inada S, Harrell DT, Haraguchi R, Ashihara T, Makita N, Nakazawa K. Ventricular arrhythmias generated from purkinje fiber network with gap junction mutation - A simulation study - . 多階層生体機能学 終了記念シンポジウム. 2015/03/06、 大阪市、 大阪大学中之島センター
 3. 蒔田直昌. 心臓イオンチャネルの遺伝子異常と機能破綻の分子基盤. 多階層生体機能学 最終成果報告会. 2015/03/05、 大阪市、 大阪大学中之島センター
 4. Ishikawa T, Nogami A, Kowase S, Harrell D, Tsuji Y, Arimura T, Kimura A, Makita N. A novel cardiac alpha-myosin heavy chain (MYH6) mutation impairing sarcomere structure responsible for familial sick sinus syndrome .European Society of Cardiology . 2014/09/02、 Barcelona,Spain.
 5. Ishikawa T, Nogami A, Kowase S, Harrell DT, Arimura T, Tsuji Y, Kimura A, Makita N. A Novel Mutation in Atrial Myosin Heavy Chain Coding Gene MYH6 Causes Sick Sinus Syndrome. 第 29 回日本不整脈学会・第 31 回日本心電学会合同学術大会 . 2014/07/24、 東京都港区、 ザ・プリンスパークタワー東京
 6. Makita N. Paradigm Shifts in the Genetics of Inherited Arrhythmias Brought on by High-throughput Sequencing and Genome-wide Association Studies. 第 29 回日本不整脈学会・第 31 回日本心電学会合同学術大会 . 2014/07/24、 東京都港区、 ザ・プリンスパークタワー東京
 7. Tsuji Y, Ishikawa T, Makita N. Role of Ca²⁺/calmodulin -dependent Protein Kinase II in Atrial and Ventricular Remodeling and Arrhythmias. 第 29 回日本不整脈学会・第 31 回日本心電学会合同学術大会 . 2014/07/24、 東京都港区、 ザ・プリンスパークタワー東京
 8. Tsuji Y, Ishikawa T, Makita N. Electrical

- Storm in Inherited Arrhythmia Syndromes.
第 29 回日本不整脈学会・第 31 回日本
心電学会合同学術大会 . 2014/07/23、
東京都港区、ザ・プリンスパークタワ
ー東京
9. Ishikawa T, Nogami A, Kowase S,
Arimura T, Kimura A, Makita N. A Novel
Cardiac a-Myosin Heavy Chain (MYH6)
Mutation Associated with Familial Sick
Sinus Syndrome Altering Sarcomeric
Organization. 35th Annual Scientific
Sessions, Heart Rhythm . 2014/05/08, San
Francisco, USA
10. Hu D, Zhang J, Li Y, Gollob M, Healey J,
Harrell DT, Makita N, Abe H, Sun Y,
Zhang L, Yan G, Mah D, Walsh E,
Leopold H, Giustetto C, Gaita F, Martinez
HB, Antzelevitch C. The Spectrum of
Most Frequent Mutation in Short QT
Syndrome. 35th Annual Scientific
Sessions, Heart Rhythm . 2014/05/08,
San Francisco, USA
11. Ishikawa T, Makita N. Genetic Basis of
Familial Sick Sinus Syndrome.
International Symposium of Inherited
Arrhythmias . 2014/03/22, Tokyo, Tokyo
Station Conference
12. Ishikawa T, Nogami A, Kowase S,
Arimura T, Kimura A, Makita N. A Novel
Mutation in Atrial Myosin Heavy Chain
Coding Gene MYH6 Causes Sick Sinus
Syndrome. 第 78 回日本循環器学会.
2014/03/22、東京都千代田区、東京国
際フォーラム
13. 蒔田直昌. 致死性不整脈の分子病態に
関する新展開. 第 91 回日本生理学会大
会 . 2014/03/18、鹿児島市、鹿児島大
学
14. 辻幸臣, 蒔田直昌. 心室細動成立に果
たすカルモジュリンキナーゼの役割と

は? 第 91 回日本生理学会大会.

2014/03/18、鹿児島市、鹿児島大学

15. 稲田慎, ダニエル・トシオ・ハーレル,
原口亮, 芦原貴司, 蒔田直昌, 中沢一
雄. ギャップ結合変異を有するプルキ
ン工線維から発生する心室性不整脈に
関するシミュレーション研究. 第 91 回
日本生理学会大会 . 2014/03/18、鹿児
島市、鹿児島大学
16. 蒔田直昌, 関明子. 家族性心臓伝導障
害家系に同定された connexin40 の遺伝
子変異と機能異常. 第 91 回日本生理学
会大会 . 2014/03/16、鹿児島市、鹿児
島大学

〔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

<http://nagasaki-molphys.org/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

蒔田 直昌 (MAKITA, Naomasa)

長崎大学医歯薬学総合研究科(医学系)・ 教
授

研究者番号 : 00312356

(2) 研究分担者

前村 浩二 (MAEMURA, Koji)

長崎大学医歯薬学総合研究科(医学系)・ 教
授

研究者番号 : 90282649

辻 幸臣 (TSUJI, Yukiomi)

長崎大学医歯薬学総合研究科(医学系)・ 講
師

研究者番号 : 60432217

(3) 連携研究者

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