

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790720

研究課題名(和文) 心臓 Na チャネル病の病態解明—心房細動モデルマウスの作製・解析—

研究課題名(英文) Analysis of the pathogenesis of cardiac Na channelopathies

研究代表者

牧山 武 (MAKIYAMA TAKERU)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：30528302

研究成果の概要(和文)：

心筋唯一の Na チャネルである SCN5A 遺伝子は、その異常により多彩な遺伝性不整脈疾患を引き起こすことが知られている。乳幼児突然死症候群(SIDS)における遺伝子解析では、SCN5A 異常を多く認め、変異チャネルは機能亢進(QT 延長症候群 3 型)のみではなく、機能低下(Brugada 症候群)も原因となっていた。また、遺伝性不整脈疾患患者にて心臓 Na チャネル結合蛋白である TCAP(Z 帯構成蛋白)遺伝子解析を行ったところ、検出された遺伝子異常が Na 電流を減少させ、本遺伝子異常による Na チャネル病発症への関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Mutations in SCN5A gene, encoding cardiac Na channels, are reported to cause a variety of arrhythmias. We performed genetic screening on sudden infant death syndrome (SIDS) and clarified that SCN5A mutations are prevalent in Japanese infants with life threatening arrhythmias, in addition, not only SCN5A gain-of-function type modulation (Long-QT syndrome type 3, but also loss-of-function (Brugada syndrome) may be a pathogenic basis of SIDS. Furthermore, we analysed TCAP gene, a member of Z-disk proteins which associate with the cardiac Na channels, on patients with inherited arrhythmias. The mutation might be associated with cardiac arrhythmias by modulating Na currents.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：不整脈、分子心臓病態学

1. 研究開始当初の背景

本邦では年間 5-10 万人が心臓突然死を来たと推測され、近年、社会でも不整脈と心臓突然死にかかわる関心が急速に高まってきている。致死性不整脈の原因としては虚血性心疾患や心筋症など器質的心疾患を背景にしたものが多いが、明らかな基礎疾患がないにも関わらず心室細動を来し、突

然死に至る例も存在し、遺伝子異常の関与が報告されている。心筋唯一の Na チャネルである SCN5A は、心筋細胞の急峻な脱分極を形成し(図 1)、心筋の興奮・収縮に重要な役割を果たす。その遺伝子異常により、以下のような様々な不整脈が引き起こされることが知られており、総じて、心臓 Na チャネル病と呼ばれる。

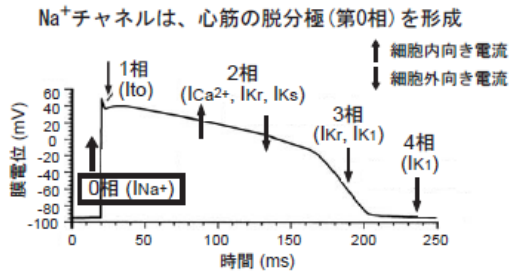


図1 心筋細胞の活動電位

心臓 Na チャンネル病

- ・ 遺伝性 QT 延長症候群 3 型・・・心電図上、QT 延長を認め、多形性心室頻拍による突然死を来す。
- ・ Brugada 症候群・・・主に中年男性において夜間睡眠中、心室細動による突然死を来す。
- ・ 進行性心臓伝導障害・・・徐脈により、ペースメーカー植込みが必要となる。
- ・ 家族性心房細動
- ・ オーバーラップ症候群・・・上記疾患の様々な組み合わせで発症するオーバーラップ。

我々は、滋賀医科大学呼吸循環器内科、堀江との共同研究により、全国の施設より、様々な遺伝性不整脈患者のゲノム DNA を集積し、解析を行ってきた。現在、登録症例は、約 1000 家系、2000 症例に及び、日本で最大規模の不整脈疾患ゲノムデータベースを構築した。

我々は、日本で初めて、Brugada 症候群に関する多症例 (38 症例) の遺伝子解析を行い、SCN5A 遺伝子異常を持つ Brugada 症候群患者では徐脈性不整脈を高率に合併し、変異チャンネルの機能解析の結果、全て無機能であることを報告した (Makiyama et al. J Am Coll Cardiol. 46:2100-6. 2005)。しかし、Brugada 症候群のうち SCN5A 遺伝子異常が検出されるのは 10-20%のみであり、最近報告された新しい原因遺伝子、GPD1L についても解析を行ったが、一例も変異は見つからず (Makiyama et al. Circ J. 72:1705-6. 2008)、大半は原因が不明なままである。

また、上記のような致死性遺伝性不整脈の解析の他に、「common disease」である心房細動の発症メカニズムに関する研究にも取り組んでいる。SCN5A 蛋白 C 末端のヘテロ 1 アミノ酸変異 (M1875T) が、SCN5A を機能亢進型に変換し、家族性心房細動を引き起こすことを世界で初めて報告した (Makiyama et al. J Am Coll Cardiol. 52:1327-34. 2008)。

このように SCN5A 遺伝子異常による心臓 Na⁺ チャンネル病は、致死性遺伝性不整脈や、「common disease」である心房細動など、多彩な表現型を示し、その病態の解明は、多くの患者の診断・治療に役立つと考え研究をす

めている。

2. 研究の目的

遺伝性不整脈患者の SCN5A 遺伝子解析、機能解析

(1) 乳幼児突然死症候群 (Sudden Infant Death Syndrome: SIDS) の解析

は、生後 1 年以内にみられる原因不明の突然死症候群であり、最近、遺伝性致死性不整脈疾患との関連が注目されている。ノルウェー人では SIDS の約 10% に QT 延長症候群の原因人遺伝子異常が検出されている (Arnestad, Crotti et al. Circulation 2007)。遺伝的素因には人種差があり、日本人のデータも重要であると考えられるが、まだ報告は少ない。我々は、以前より、全国の施設から集積した遺伝性不整脈疾患ゲノムデータベースを構築しており、本研究においては、生後 1 年以内に致死性不整脈を呈した患者に注目し、その遺伝的背景の検討を行った。

(2) Telethonin (TCAP) の Na チャンネル病への関連

心筋の Z 帯構成蛋白の一つである Telethonin (TCAP) は、心筋細胞の構造維持・機能に重要な働きをすることが知られている。最近、偽性腸閉塞症例において検出された TCAP 遺伝子異常が、心臓 Na チャンネルと結合し Na 電流を変化させることが報告されたが (Mazzone JBC. 2008)、遺伝性不整脈疾患における TCAP 遺伝子の関与については不明である。

我々は、現在まで約 1000 家系、2000 症例に及ぶ不整脈疾患ゲノムライブラリーを構築しており、本ゲノムライブラリーを用いた遺伝子解析、また、検出された遺伝子変異の心臓 Na 電流に対する影響を解析した。

3. 研究の方法

(1) SIDS の解析

我々は、1 歳以下にて QT 延長または、致死性不整脈を呈した乳幼児 9 症例を対象に主なイオンチャンネル病の候補遺伝子 (KCNQ1, KCNH2, KCNE1-5, KCNJ2, SCN5A) の遺伝子解析を行った。具体的には、末梢血リンパ球より DNA を抽出し、候補遺伝子に関して、高速液体クロマトグラフィー (DHPLC) を用いた網羅的スクリーニングを行った。検出された遺伝子変異に関しては、変異チャンネルを作製し、培養細胞 (HEK293 細胞) に発現させ、ホールセル・パッチクランプ法を用いた電気生理学的機能解析を行った。

(2) Telethonin (TCAP) の Na チャンネル病への関連

多施設より集積した日本人遺伝性不整脈疾患ゲノムライブラリーのうち発端者 547 例

(QT 延長症候群 213 例、Brugada 症候群 284 例、洞不全症候群 19 例、不整脈源性右室心筋症 18 例、拡張型心筋症 7 例、特発性心室細動 6 例) において TCAP 遺伝子スクリーニングを施行した。コントロールとして 259 例の正常健康人のゲノムを用いた。また、検出された TCAP 遺伝子変異に関しては、変異を導入したプラスミドを作製し、ヒト胎児腎 (HEK) 培養細胞に心臓 Na チャネル α サブユニット、 $\beta 1$ サブユニットと共発現させ、ホールセル・パッチクランプ法を用いた電気生理学的機能解析を行った。本研究は、京都大学医の倫理委員会にて承認済みである。

4. 研究成果

(1) SIDS の解析

乳幼児 9 症例の患者背景は、男児 4、女児 5、平均発症年齢 2.3 ± 3.1 歳、突然死の家族歴を 3 症例に認め、心室頻拍 (ventricular tachycardia: VT) が記録されたのは 5 例、QT 延長を呈した症例 8 例、平均 QTc 間隔 0.62 ± 0.1 sec であった。

遺伝子解析の結果、9 症例中、4 症例 (44.4%) において心臓 Na チャネル (SCN5A) 遺伝子異常を検出した。(図 2) 他の K チャネル遺伝子に異常は認めなかった。

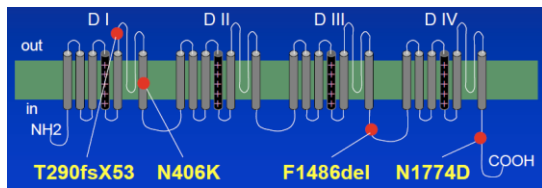


図 2 心臓 Na チャネルの模式図と検出された遺伝子異常

3 症例 (N406K, F1486del, N1774D) では、出生直後、著明な QT 延長と Torsade de Pointes を認めた。特に F1486del は QTc 0.86 sec、N1774D は、QTc 0.72 sec と著明な QT 延長を来し、T 波が次の P 波より後になるため 2:1 房室ブロックを呈していた。T290fsX53 は、4 歳女児の症例で 6 カ月時と 4 歳児に VT storm を呈した。興味深いことに患児は右側胸部誘導にて Brugada 心電図様 ST 上昇を伴い、父も Brugada 症候群の診断にて植込み型除細動器治療を受けていた。遺伝子解析の結果、父も同じ遺伝子異常のキャリアーであった。パッチクランプ法を用いた電気生理学的機能解析では、N1774D では、遅延 Na 電流を認め、QT 延長症候群 3 型にみられる Na チャネル機能亢進の所見であった。(図 3, 4)

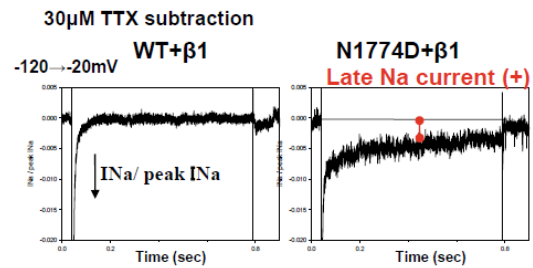


図 3 変異チャネルで記録された遅延 Na 電流

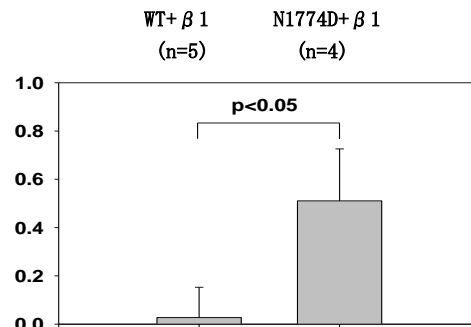


図 4 late Na/ peak Na 電流

また、T290fsX53 は、全く Na 電流を形成しない、non-functional なチャネルであり、こちらは、Brugada 症候群でみられる Na チャネル機能低下の所見であった。

ノルウェー人における SIDS の遺伝子解析では、イオンチャネル遺伝子異常を約 10% に認め、その約半数は Na チャネル遺伝子異常であり、全て機能亢進の所見であった。(Wanget et al. Circulation 2007) 我々の解析でもやはり、Na チャネル遺伝子異常が主であったが、興味深いことに機能低下の Brugada 症候群も認められた。致死性不整脈を呈した乳幼児において、心臓 Na チャネル異常を多く認め、乳幼児突然死症候群 (SIDS) との関連が示唆された。また、心臓 Na チャネルの機能亢進 (QT 延長症候群 3 型) のみではなく、機能低下 (Brugada 症候群) も原因となり得ると考えられた。

(2) Telethonin (TCAP) の Na チャネル病への関連

547 例における TCAP 遺伝子解析の結果、表のように遺伝子異常 1 つ、遺伝子多型 (rare variant) 3 つを検出した。(図 5) E49K は不整脈源性右室心筋症患者にて検出し、A97T は QT 延長症候群において、E132Q は QT 延長症候群の 2 例において検出した。R153H は、QT 延長症候群、Brugada 症候群の 2 症例にて検出した。3 つの rare variant (E49K, E132Q, R153H) は、正常コントロール 518 アレル中それぞれ 1 アレル (0.19%) にて検出された。

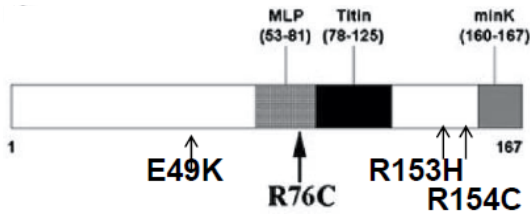


図5 検出された TCAP 遺伝子変異

検出された変異チャンネルを HEK 細胞に心臓 Na チャンネルと共発現させ電流計測したところ TCAP-WT を加えることにより、Na チャンネルは増加した。(Mock -83.3 ± 9.3 pA/pF, WT -173.7 ± 34.1 pA/pF, -20 mV にて計測) (図 6)

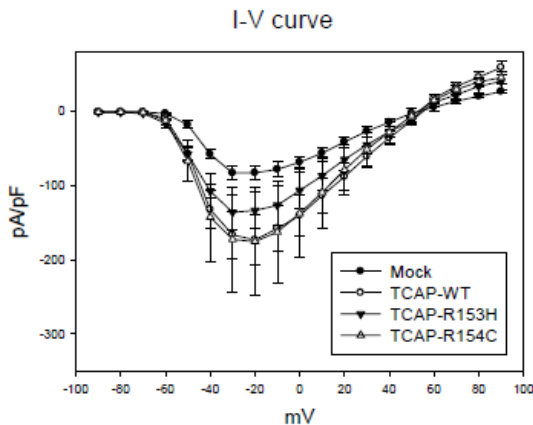


図6 電流・電圧曲線
(変異 TCAP が Na 電流に与える影響)

また、Na チャンネルの活性化・不活性化を解析したところ、R153H は、不活性化曲線を -15.2 mV 過分極側へシフトさせ、結果として loss-of-function を示唆する所見であった。(図 7) 活性化曲線は特に変化を認めなかった。

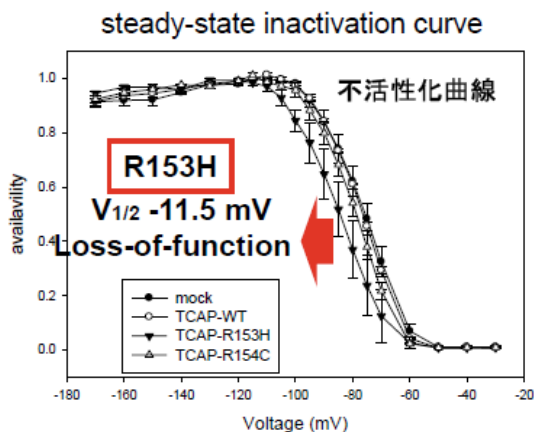


図7 Na 電流、不活性化曲線

TCAP 遺伝子と疾患の関係に関して、Mazzone らは、偽性腸閉塞症例において、TCAP-R76C 変異を検出し、機能解析の結果、Na 電流を増

加させると報告した (Mazzone et al. JBC. 2008)。心臓 Na チャンネル病は様々な遺伝子異常を引き起こすが、全ての患者で心臓 Na チャンネル変異が検出されるわけではなく、このような結合蛋白がチャンネル電流に影響し遺伝性不整脈疾患の原因となり得ることが考えられた。さらなる家系解析、他の異常の機能解析が必要であると考ええる。

また、TCAP-R153H 変異は肥大型心筋症症例において報告されている (Hayashi et al. JACC 2004)。我々が R153H を検出した 2 症例はそれぞれ QT 延長症候群、Brugada 症候群であり、心肥大は認めなかったが、解析の結果 Na チャンネル電流の不活性化曲線の過分極偏位を認めた。本変異と疾患との関連に関しては、さらなる家系解析やモデル動物、疾患特異的 iPS 細胞を用いた解析にて重要な知見が得られるのではと期待される。

以上のように、本研究において、遺伝性不整脈疾患ゲノムライブラリーにおける TCAP 遺伝子解析の結果、遺伝子異常 1 つ、遺伝子多型 (rare variant) 3 つを検出した。うち TCAP-R153H は、不活性化曲線を -15.2 mV 過分極側へシフトさせ結果として loss-of-function を示唆する所見であった。本研究により、TCAP 遺伝子異常が遺伝性不整脈疾患に関与している可能性が示唆された。

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 12 件)

- ① Doi T, Makiyama T, Morimoto T, Haruna Y, Tsuji K, Akao M, Takahashi Y, Kimura T, Horie M. A novel KCNJ2 nonsense mutation, S369X, impedes trafficking and causes a limited form of Andersen-Tawil Syndrome. Circulation Cardiovascular Genetics. 査読有. 2011 Apr 14. In press.
- ② Ohno S, Zankov D, Ding W, Makiyama T, Doi T, Shizuta S, Itoh H, Nishio Y, Hattori T, Matsuura H, Horie M. Novel KCNE5 variants are associated with Brugada syndrome and idiopathic ventricular fibrillation. Circulation Arrhythmia and Electrophysiol. 査読有. 2011 Apr 14. In press.
- ③ Miyamoto A, Hayashi H, Makiyama T, Yoshino T, Mizusawa Y, Sugimoto Y, Ito M, Xue JQ, Murakami Y, Horie M. Risk Determinants in Individuals With a Spontaneous Type 1 Brugada ECG. Circ J. 査読有. 2011 Apr;75(4):844-51.
- ④ Oka Y, Itoh H, Ding WG, Shimizu W,

- Makiyama T, Ohno S, Nishio Y, Sakaguchi T, Miyamoto A, Kawamura M, Matsuura H, Horie M. Atrioventricular block-induced Torsades de Pointes with clinical and molecular backgrounds similar to congenital long QT syndrome. *Circ J*. 査読有. 2010 Nov 25;74(12):2562-71.
- ⑤ Nagaoka I, Shimizu W, Mizusawa Y, Sakaguchi T, Itoh H, Ohno S, Makiyama T, Yamagata K, Makimoto H, Miyamoto Y, Kamakura S, Horie M. Heart rate-dependent variability of cardiac events in type 2 congenital long-QT syndrome. *Europace*. 査読有. 2010 Nov;12(11):1623-9.
- ⑥ Itoh H, Shimizu W, Hayashi K, Yamagata K, Sakaguchi T, Ohno S, Makiyama T, Akao M, Ai T, Noda T, Miyazaki A, Miyamoto Y, Yamagishi M, Kamakura S, Horie M. Long QT syndrome with compound mutations is associated with a more severe phenotype: a Japanese multicenter study. *Heart Rhythm*. 査読有. 2010 Oct;7(10):1411-8.
- ⑦ Watanabe H, Makiyama T, Koyama T, Kannankeril PJ, Seto S, Okamura K, Oda H, Itoh H, Okada M, Tanabe N, Yagihara N, Kamakura S, Horie M, Aizawa Y, Shimizu W. High prevalence of early repolarization in short QT syndrome. *Heart Rhythm*. 査読有. 2010 May;7(5):647-52.
- ⑧ 牧山武, 静田聡, 赤尾昌治, 木村剛, 堀江稔家族性ペースメーカー植込み症例における遺伝的背景の検討—心臓Na⁺チャンネル病、Lamin A/C 遺伝子関連心筋症—心電図. 査読有. 2010 30:201-209
- ⑨ Itoh H, Sakaguchi T, Ding WG, Watanabe E, Watanabe I, Nishio Y, Makiyama T, Ohno S, Akao M, Higashi Y, Zenda N, Kubota T, Mori C, Okajima K, Haruna T, Miyamoto A, Kawamura M, Ishida K, Nagaoka I, Oka Y, Nakazawa Y, Yao T, Jo H, Sugimoto Y, Ashihara T, Hayashi H, Ito M, Imoto K, Matsuura H, Horie M. Latent genetic backgrounds and molecular pathogenesis in drug-induced long-QT syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 査読有. 2009 Oct;2(5):511-23.
- ⑩ Nishio Y, Makiyama T, Itoh H, Sakaguchi T, Ohno S, Gong YZ, Yamamoto S, Ozawa T, Ding WG, Toyoda F, Kawamura M, Akao M, Matsuura H, Kimura T, Kita T, Horie M. D85N, a KCNE1 polymorphism, is a disease-causing gene variant in

long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 査読有. 2009 Aug 25;54(9):812-9.

- ⑪ Yamamura K, Muneuchi J, Uike K, Ikeda K, Inoue H, Takahata Y, Shiokawa Y, Yoshikane Y, Makiyama T, Horie M, Hara T. A novel SCN5A mutation associated with the linker between III and IV domains of Na(v)1.5 in a neonate with fatal long QT syndrome. *Int J Cardiol*. 査読有. 2010 Nov 5;145(1):61-4.
- ⑫ Ohno S, Toyoda F, Zankov DP, Yoshida H, Makiyama T, Tsuji K, Honda T, Obayashi K, Ueyama H, Shimizu W, Miyamoto Y, Kamakura S, Matsuura H, Kita T, Horie M. Novel KCNE3 mutation reduces repolarizing potassium current and associated with long QT syndrome. *Hum Mutat*. 査読有. 2009 Apr;30(4):557-63.

[学会発表] (計7件)

- ① 牧山武: Inherited Ventricular Arrhythmic Disorders in Asia: What's New and What's Different from US and Europe? *Heart Rhythm*, Denver, USA, 5. 15, 2010.
- ② 牧山武: Both Gain- and Loss-of-Function Mutations in the Cardiac Na⁺ Channel Gene, SCN5A, are Associated with Sudden Infant Death Syndrome (SIDS). 第74回日本循環器学会学術集会 (Focus session), 京都, 3. 5-7, 2010.
- ③ 牧山武: Dilated Cardiomyopathy: DCM, Case presentation. 第74回日本循環器学会学術集会 (Focus session), 京都, 3. 5-7, 2010.
- ④ 牧山武: 学術諮問委員会指定トピックス【不整脈の遺伝子診断】: 家族性ペースメーカー植込み症例における遺伝的背景の検討—心臓Na⁺チャンネル病、lamin A/C 関連心筋症—, 第24回日本不整脈学会学術大会/第26回日本心電学会学術集会 合同学術集会, 京都, 7. 2-4, 2009.
- ⑤ 牧山武: SCN5A and Lamin A/C gene mutations are highly prevalent in patients with familial bradyarrhythmic disorders. 第73回日本循環器学会学術集会, 大阪, 3. 20-22, 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧山 武 (MAKIYAMA TAKERU)
 京都大学・医学研究科・助教
 研究者番号: 30528302