

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790749

研究課題名(和文)

致死性不整脈の分子生物学的、電気生理学的検討

研究課題名(英文)

Molecular and electrophysiological analysis of fatal arrhythmias

研究代表者

相澤 義泰 (AIZAWA YOSHIYASU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20528145

## 研究成果の概要(和文):

家族性心房細動症例に対し、書面にて説明し同意を得た上で、遺伝子解析目的の末梢血採取を行った。これまでに収集したサンプルは6家系、内訳は家族性4例、若年性2例であった。これらの家系に対しPCR、DNAシーケンスにて塩基配列を解析した。候補遺伝子アプローチにより、*KCNQ1*、*KCNH2*、*SCN5A*、*KCNE1*、*KCNE2*、*KCNJ2*、*CACNA1C* 遺伝子の解析を行なった。これまでに家族性心房細動において報告のある遺伝子において変異は同定されなかった。今後、次世代シーケンサーの応用により原因遺伝子の検索を行なう予定である。

## 研究成果の概要(英文):

We collected blood samples of the patients with familial atrial fibrillation after obtained written informed consent. So far, six pedigrees including four familial and two younger cases were included. Of those pedigrees, one patient suffered from atrial fibrillation from their thirties. He has the history of the catheter ablation for atrial fibrillation previously. He has the family history of atrial fibrillation of his brother and his father. The DNA was sequenced for *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNJ2*, and the *CACNA1C*.

## 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：遺伝性不整脈、イオンチャンネル、心房細動、変異、パッチクランプ法

## 1. 研究開始当初の背景

心房細動(AF)は臨床において最も良く遭遇する不整脈であるが、一部に遺伝性疾患が含まれるという認識は薄かった。しかし、既に1943年に家族発生例が報告されおり、フラミンガム研究では、少なくとも両親の一方にAFが確認された2243人の681人(30%)のうち、経過観察中にAFを発症したものは70人(10%)であったことが示されている。こ

れは片親がAFに罹患した場合、子のAF発症リスクは両親にAFがない場合に比べて1.85倍に相当する。さらに過去に心筋梗塞、心不全および弁膜症などAF発生の危険因子となる病態の既往のない75歳未満を対象にすると、オッズ比は3.17と増加した。Darbarらは914人のAF患者のうち lone AFは36%であり、lone AFの15%にAFの家族歴が存在したと報告している。1997年にBrugadaらは優性遺伝形式をとるスペインのAFの3家系を報

告し、連鎖解析によりその遺伝子座を10q22-24に初めて同定した。しかしその後この遺伝子は未だ明らかになっていない。家族性AFにおいて2003年、Chenらは優性遺伝形式を示すAFの中国人の4家系を解析し、11p15.5に存在するKCNQ1に遺伝子異常(S140G)を同定した。(Science, 299:251-4.) 次いでKCNH2, KCNE2変異が報告された。

図：心房細動の原因遺伝子

AF as a Monogenic Disease			
Gene	Locus	Nucleotide/ Amino acid Change	Reference
<b>Gene identified</b>			
KCNQ1	11p15.5	A418G/S140G	Chen et al. Science 2003
KCNH2	31q23.1	C797R/P16	Yang et al. Am J Hum Genet 2004
KCNJ2	17q23.1, 24.2	G277A/V93I	Xu et al. BMC 2005
KCNK4	10q85	G1123T/E372S	Ghosh et al. Hum Mol Genet 2006
GATA4	1q21.1	G15A/G38D	Cellab et al. NEMO 2006
		C261I/P38S	"
		G286T/A38S	"
		A487G/S163Y	"
<b>Locus identified</b>			
	10q23.34	AD	Romano et al. NEJM 1997
	6q.4-14	AD	Ellerby et al. Circulation 2001
	7p.3	AR	Ghosh et al. Circulation 2004

また、AFの発症につながる遺伝多型もいくつか報告されている。

図：心房細動に関連する遺伝子多型

Polymorphisms associated with AF		
Gene	Nucleotide change	Reference
<b>Polymorphism</b>		
KCNK1	38G	Reyn et al. Am Heart J 2002
KCNK3	97T	Lai et al. Am J Cardiol 2003
Cc-40	-44(G to A)	Ricciardi et al. Circ Res 2004
	+71(A to G)	"
ACE	M235T	Tsai et al. Circulation 2004
	G-6A	"
	G-217A	"

この様に極めてありふれた心房細動の発生機序に、心筋イオンチャネルの遺伝子異常が関与し、発生と維持および心室筋ではQT短縮などに関与する可能性がある。しかし、心房細動に関連する遺伝子異常はなお未知の部分が多く、その病態の解明が急務である。

## 2. 研究の目的

孤立性の若年発症例あるいは家族内発生が認められる心房細動を中心に、チャネルの遺伝子学的検討と、異常の見出された例では細胞電気生理学的検討を行う。例えばKチャネルの電流の増大(gain of function)は、活動電位持続時間を短縮させることから心房細動の発生と維持に促進的に働くことがい

える。この様に、心房細動を心筋のチャネル病として捉え、機序と病態を明らかにすることを目的とする点に本研究の特徴がある。心房細動をチャネル病として捉えることが出来、病因が解明されれば、何故65歳以上の高齢者が心房細動全体の80%を占めるのかの点も解明できる可能性がある。また、全国から症例の集積を行い共同研究の体制で臨む予定である。

## 心房細動の新規遺伝子変異の同定

## 変異チャネルの機能解析

## 結果の検討

## 臨床応用：新たな治療法、テーラーメイド医療

## 3. 研究の方法

若年発症例や家族発症例の心房細動症例において、候補遺伝子アプローチ法によりこれまで報告の無い遺伝子異常を明らかにする。明らかになった遺伝子異常に対して、電気生理学的に機能解析を行う。必要に応じて共焦点レーザー顕微鏡、動物実験などを行う。得られた実験データから心房細動の発生機序と病態を解明し、臨床応用の可能性およびテーラーメイド医療の可能性を探索する。

### (1) Mutagenesis

イオンチャネルの遺伝子変異をsite directed mutagenesis法にて作成し、哺乳類動物細胞に変異チャネル蛋白を発現させる目的で発現ベクターにサブクローニングする。

### (2) 哺乳類動物細胞への遺伝子発現

発現にはHEK293, COS-7, tsa201細胞などの哺乳類動物細胞を35mm細胞培養用ディッシュにて飼育する。細胞をリポフェクション法にて遺伝子導入を行う。遺伝子導入から24-72時間以内に機能解析を行う。遺伝子導入の成功の有無の判断は、GFP発現ベクターの共導入にて行う。また、標的チャネルに応じてサブユニット以外にもサブユニットも発現させる。

## サンプル収集 (DNA)

### 遺伝子解析

変異チャネル同定

### 機能解析

パッチクランプ法、共焦点レーザー顕微鏡など

## 4. 研究成果

心房細動患者のうち、若年発症(40歳未満)および家族内集積を示す症例に対し、書面にて説明をし同意を得る。同意が得られた患者より末梢血 20ml を採取し、リンパ球よりゲノム DNA を抽出した。

候補遺伝子のエクソンコード領域を特異的に増幅するプライマーを設計し PCR、DNA シークエンスにて塩基配列を解析した。

これらの家系に対し PCR、DNA シークエンスにて塩基配列を解析した。候補遺伝子アプローチにより、KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNE2, KCNJ2, CACNA1C 遺伝子の解析を行なった。

これまでに家族性心房細動において報告のある遺伝子において変異は同定されなかった。今後、次世代シーケンサーの応用により原因遺伝子の検索を行なう予定である。

## 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4件)

Yoshiyasu Aizawa, Tomohiro Matsuhashi, Toshiaki Sato, Seiji Takatsuki, Keiichi Fukuda. A danger of induction of Brugada syndrome during pill-in-the-pocket therapy for paroxysmal atrial fibrillation. Drug, Healthcare and Patient Safety. 2010, Volume 2010:2 Pages 139 - 140. (査読あり)

Aizawa Y, Kohsaka S, Suzuki S, Atarashi H, Kamakura S, Sakurai M, Nakaya H, Fukatani M, Mitamura H, Yamazaki T, Yamashita T, Ogawa S; J RHYTHM Investigators. Comparison of antiarrhythmics used in patients with paroxysmal atrial fibrillation: subanalysis of J RHYTHM Study. Circ J. 2010;74(1):71-6. Epub 2009. (査読あり)

Matsuhashi T, Sato T, Aizawa Y, Takatsuki S. Recurrent Torsade de Pointes during mild hypothermia therapy for a survivor of sudden cardiac arrest due to drug-induced long-QT syndrome. J Cardiovasc Electrophysiol. 2010;21(4):462-3. Epub 2009. (査読あり)

Sato A, Arimura T, Makita N, Ishikawa T, Aizawa Y, Ushinohama H, Aizawa Y, Kimura A. Novel mechanisms of trafficking defect caused by KCNQ1 mutations found in long QT syndrome. J Biol Chem. 2009 11;284(50):35122-33. Epub 2009. (査読あり)

### 〔学会発表〕(計5件)

相澤義泰 他「39.9 の発熱により顕在化した Brugada 症候群の1例」。第9回平岡不整脈研究会 2010年12月11日、静岡県熱海市。

安西淳、相澤義泰 他。発熱を契機に失神し、解熱とともに心電図変化が改善した Brugada 症候群の1例。第218回関東甲信越地方会 2010年12月4日 東京都千代田区。

Yoshiyasu Aizawa et al. Clinical and Molecular Characteristics of the Patient with Brugada Syndrome Unmasked by Fever. The 3rd Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session (APHRs 2010). October 28 to 30, 2010 Jeju, Korea.

相澤義泰 他。ICD 植込み患者における T-wave oversense による不適切作動の臨床的特徴およびその対処法に関する検討。第25回不整脈学会学術集会。2010年6月11,12日、名古屋国際会議場。

Yoshiyasu Aizawa et al. Usefulness of the Mutational Analysis Using Buccal Swabs in a Family with Congenital Long QT Syndrome. The 74<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. March 5-7, 2010, Kyoto, Japan.

### 〔図書〕(計4件)

相澤義泰, 香坂俊。【急性心不全】同期不全の病態生理。Intensivist, 2巻4号 Page813-821. MEDSi, 2010年。

相澤義泰, 小川聡。特発性心室細動の臨床像。呼吸と循環, 58巻1号 Page17-20. 医学書院, 2010年。

相澤義泰，香坂俊．心房細動治療の科学  
と実践，再発予防策と治療抵抗性心房  
(粗)細動の治療./特集)：Intensivist，  
1 巻 4 号 Page787 -793. MEDSi, 2010 年.  
相澤義泰，小川聡【心房細動の総合的マ  
ネージメント】レートコントロールとリ  
ズムコントロール．最新医学 64 巻 8 号  
Page1677 -1683. 最新医学社，2009 年.

〔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  
なし

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

相澤 義泰 (AIZAWA YOSHIYASU)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：20528145

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし