

令和元年5月27日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04823

研究課題名(和文) 心筋イオン輸送体の遺伝子異常に起因する致死性不整脈の新規病態メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of novel pathophysiology underlying lethal arrhythmia due to mutations in cardiac ion transporters

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) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：心電図のQT短縮とJ波を特徴とし、心室細動による突然死をきたす致死性不整脈の家系で網羅的遺伝子解析を行い、心筋トランスポーターNa/Ca交換系(NCX1)の遺伝子SLC8A1に遺伝子変異を12個を同定した。COS7細胞に発現させた変異NCX1は電流が有意に小さく、⁴⁵Ca取り込み能も低下していた。致死性不整脈の多くはイオンチャネルの遺伝子異常と考えられてきたが、今回の研究によって、トランスポーターの遺伝子変異による細胞内Ca調節機構の異常が、致死性不整脈の新たな機序として明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓突然死にはこれまで様々な心電図マーカーが報告され、器質的心疾患のない心室細動(特発性心室細動)の原因遺伝子にもいくつかの原因遺伝子が報告されてきた。しかし変異の判明率は低いとため、特発性心室細動の分子病態の全体像はつかめておらず、遺伝子解析の結果を予後予測や突然死予防に応用することはできていなかった。今回我々はQT短縮とJ波を特徴とする特発性心室細動に、これまで全く知られていなかった心臓のトランスポーターの変異を同定し、新たな致死性不整脈の疾患範疇を解明した。今後この疾患の分子病態をさらに解析することで、心臓突然死の発症前予測と予防を推進できると期待している。

研究成果の概要(英文)：By using target exon panel sequencing for 450 cardiac disease-related genes, we identified, for the first time, 12 mutations in SLC8A1, the gene encoding for cardiac Na/Ca exchanger (NCX1) in patients with idiopathic ventricular fibrillation associated with QT shortening and J waves on ECG. Mutant NCX1 transiently expressed in COS-7 cells exhibited significantly reduced NCX1 current compared with wild-type NCX1, and impaired ⁴⁵Ca uptake. Although it has been generally accepted that most inherited lethal arrhythmia are attributable to the mutations in cardiac ion channel genes, our study clearly demonstrates that there is a distinct inherited lethal arrhythmia entity associated with mutations in cardiac transporter genes.

研究分野：不整脈学

キーワード：Na-Ca交換体 トランスポーター 早期再分極症候群 QT短縮症候群 遺伝子変異 心臓突然死

1. 研究開始当初の背景

遺伝性致死性不整脈の分子病態に関する研究は、先天性 QT 延長症候群(LQTS)の原因遺伝子として 3 つの心筋イオンチャネルを解明した 1995 年の連鎖解析によって劇的な幕を開けた。しかしイオンチャネルを標的とした候補遺伝子解析では原因遺伝子が解明されない致死性不整脈遺伝子が少なくない。心筋トランスポーターやポンプなどの心筋イオン輸送体は、脱分極で攪乱された細胞内イオン環境を回復させ恒常性を保つ、生命の基本ともいべき機能分子である。最近、遺伝性不整脈と心筋イオン輸送体との強い関連を示唆する網羅的遺伝子解析が発表されたことから、「心筋イオン輸送体の遺伝子変異と細胞内 Ca 制御異常」を介した新たな病態メカニズムの存在が想定される。

2. 研究の目的

自らの予備的知見と本年発表された GWAS をもとに、心筋イオン輸送体が致死性不整脈の新たな病因であるという仮説を確固たるものにするのである。そのために、(1) 致死性不整脈患者に対して心筋イオン輸送体と Ca 制御蛋白を含めた網羅的遺伝子解析を行い、(2) 細胞発現系や疾患 iPS 心筋細胞を用いた機能解析によって致死性不整脈の新たな疾患概念を確立する。さらにこれらの研究を通じて、(3) 心臓突然死の予知・予防に貢献したいと考える。

3. 研究の方法

本研究では、心筋イオン輸送体に焦点を当てた遺伝子解析で致死性不整脈患者に新規変異を同定し、さらに iPS 心筋細胞などを用いた機能解析で新たな不整脈発症機序を解明する。具体的には研究期間内に以下の項目を明らかにする。具体的には、(1) 心筋のイオン輸送体および Ca 制御タンパクを含めた約 400 遺伝子のターゲットとする拡大エクソンシーケンス、(2) 遺伝子異常が判明した Na-Ca 交換体、Na-K ポンプ、Ca ポンプの変異の機能異常を *in vitro* 発現系を用いた解析 (3) 患者由来 iPS 細胞を心筋細胞に分化し、電気生理学的解析と細胞内 Ca イメージングを用いたイオン輸送体変異の機能評価、を行う。

4. 研究成果

心電図の早期再分極パターン(J 波)は長らく良性所見と考えられてきたが、心室細動や突然死との関連が判明するとともに、早期再分極症候群(ERS)という致死性不整脈の独立した疾患概念が生まれた。

(1) ERS 患者の網羅的遺伝子解析

心室細動(VF)の既往のある ERS 患者 50 人に対して心臓関連 457 遺伝子パネルの網羅的シーケンス解析を行ったところ、6 家系に心筋 Na/Ca 交換体(NCX1)の遺伝子 *SLC8A1* の rare variant 5 個を同定した。これらの患者は高率に心電図で QT 短縮を示した。次に、特発性心室細動 (IVF)183 人の全エクソン解析の結果を再解析したところ、*SLC8A1* の rare variant 4 個を同定し、変異不明の IVF 患者に対する *SLC8A1* の Sanger シーケンスで rare variant 4 個を同定した。フランスの共同研究者も同様に解析を行い 6 家系の IVF に 4 個の *SLC8A1* の rare variant を同定した。これらを総合すると、日仏の ERS 患者において *SLC8A1* 変異が 13 種類 (うちミスセンス変異 11 個、1 塩基欠損による欠失変異 1 個、スプライシング部位の変異 1 個) 同定され、変異キャリアはいずれも QT 短縮と J 波を示し、VF の既往または突然死の家族歴を有していた。

(2) NCX1 電流のパッチクランプ解析

ヒト NCX1 の cDNA をクローニングし、QuikChange 法で上記のうちスプライシング変異を除く 12 個の遺伝子変異をプラスミドに導入した。変異プラスミドを COS-7 細胞にトランスフェクションし、Watanabe ら (Eur J Pharmacol 2004) の方法で Whole-cell パッチクランプ法を用いて NCX 交換電流を測定した。5 mM NiCl₂ の非存在下と存在下で Na/Ca 交換電流を測定し、Ni 感受性 NCX1 電流密度を算出した。12 個の変異 NCX1 のうち 10 個は無機能または野生型よりも有意に電流量が低下していた (図 1)。

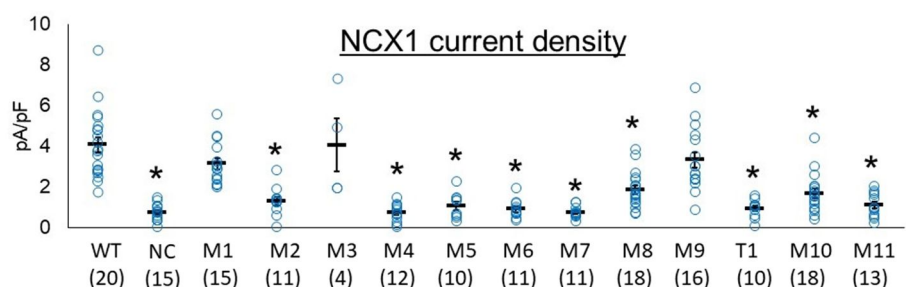


図1. *SLC8A1*変異12個のNCX1電流密度 WT:野生型, NC: Negative control, M1-M11: ミスセンス変異、T1: 1塩基欠損欠失変異、*: $p < 0.05$, () : 測定細胞数。12個中10個の変異が機能低下を示した。

(3) ^{45}Ca 取り込み能とビオチン化による膜トラフィッキングの評価

5個の変異で変異は ^{45}Ca 取り込み能が有意に低下し、膜のビオチン化と免疫染色実験からは、膜トラフィッキング異常も同定された。

(4) コンピュータシミュレーション

ヒト心室筋のシミュレーションモデル（姫野モデルおよび O'Hara-Rudy モデル）を使って活動電位を計測したところ、NCX1 電流の50%低下によって活動電位持続時間が有意に短縮することが判明した（図2）。

(5) 結論

QT 短縮と J 波を特徴とする特発性心室細動の原因として、これまで知られていなかった心筋トランスポータ遺伝子 *SLC8A1* の異常が明らかになった。

(6) 今後の方針

QT 短縮と J 波を特徴とする特発性心室細動に関して、日本とフランスの複数家系を示し、臨床型（臨床像・心電図など）遺伝型（遺伝子変異）の対比、発現系を用いた変異の機能評価、コンピュータシミュレーションを合わせて国際共著論文を執筆中である。また、Crispr/Cas9 法を用いて NCX1 のミスセンス変異のノックインマウスを作成し3系統樹立した。iPS 心筋細胞とノックインマウスの研究は、2018年から3年間の基盤(B)「心筋 Na/Ca 交換体の遺伝子異常がもたらす致死性不整脈症候群の新規分子病態」(研究代表者 蒔田直昌；18H02808)で研究を継続中である。

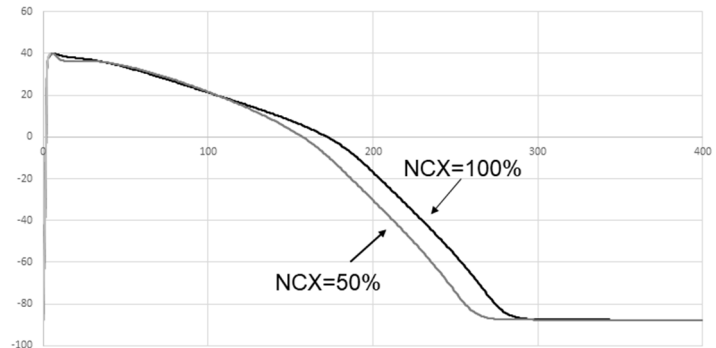


図2. ヒト心室筋細胞O'Hara Rudyモデルによるシミュレーション（心筋内膜側）NCX=100%（健常）と50%（無機能のヘテロキャリアを想定）で活動電位を発生し、1,000回目の定常記録。NCXの低下とともに活動電位持続時間が短縮している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計23件、すべて査読あり)

1. Shimizu W, Makita N et al. Association of Genetic and Clinical Aspects of Congenital Long QT Syndrome With Life-Threatening Arrhythmias in Japanese Patients. *JAMA Cardiol* 4(3):246-254, 2019. 10.1001/jamacardio.2018.4925
2. Nakano Y, Makita N et al. *HCN4* Gene Polymorphisms Are Associated With Occurrence of Tachycardia-Induced Cardiomyopathy in Patients With Atrial Fibrillation. *Circ Genom Precis Med* 11(7):e001980, 2018. 10.1161/CIRCGEN.117.001980
3. Nakajima K, Makita N et al. Clinical Manifestations and Long-Term Mortality in Lamin A/C Mutation Carriers From a Japanese Multicenter Registry. *Circ J* 82(11):2707-2714, 2018. 10.1253/circj.CJ-18-0339
4. Kozasa Y, Makita N et al. *HCN4* pacemaker channels attenuate the parasympathetic response and stabilize the spontaneous firing of the sinoatrial node. *J Physiol* 596(5):809-825, 2018. 10.1113/JP275303
5. Gray B, Makita N et al. Lack of genotype-phenotype correlation in Brugada Syndrome and Sudden Arrhythmic Death Syndrome families with reported pathogenic *SCN1B* variants. *Heart Rhythm* 15(7):1051-1057, 2018. 10.1016/j.hrthm.2018.03.015
6. Yamamoto Y, Makita N et al. Allele-specific ablation rescues electrophysiological abnormalities in a human iPS cell model of long-QT syndrome with a *CALM2* mutation. *Hum Mol Genet* 26(9):1670-1677, 2017. 10.1093/hmg/ddx073
7. Yamagata K, Makita N et al. Genotype-Phenotype Correlation of *SCN5A* Mutation for the Clinical and Electrocardiographic Characteristics of Proband With Brugada Syndrome: A Japanese Multicenter Registry. *Circulation* 135(23):2255-2270, 2017. 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027983
8. Takahashi K, Makita N et al. A novel *de novo* calmodulin mutation in a 6-year-old boy who experienced an aborted cardiac arrest. *HeartRhythm Case Rep* 3(1):69-72, 2017. 10.1016/j.hrcr.2016.09.004
9. Seki A, Makita N et al. Progressive atrial conduction system defects associated with bone malformation caused by a connexin45 mutation. *J Am Coll Cardiol* 70(3):58-70, 2017. 10.1016/j.jacc.2017.05.039
10. Oshima Y, Makita N et al. Postmortem genetic analysis of sudden unexpected death in infancy: neonatal genetic screening may enable the prevention of sudden infant death. *J Hum Genet* 62(11):989-995, 2017. 10.1038/jhg.2017.79
11. Nishiuchi S, Makita N et al. Gene-Based Risk Stratification for Cardiac Disorders in *LMNA* Mutation Carriers. *Circ Cardiovasc Genet* 10(6):e001603, 2017. 10.1161/CIRCGENETICS.116.001603
12. Kuroda Y, Makita N et al. Flecainide ameliorates arrhythmogenicity through NCX flux in Andersen-Tawil syndrome-iPS cell-derived cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res* 9:245-256, 2017. 10.1016/j.bbrep.2017.01.002
13. Ishikawa T, Makita N et al. Sick sinus syndrome with *HCN4* mutations shows early onset and frequent association

with atrial fibrillation and left ventricular noncompaction. *Heart Rhythm* 14(5):717-724, 2017. 10.1016/j.hrthm.2017.01.020

14. Hu D, Makita N et al. The Phenotypic Spectrum of a Mutation Hotspot Responsible for the Short QT Syndrome. *JACC Clin Electrophysiol* 3(7):727-743, 2017. 10.1016/j.jacep.2016.11.013
15. Yagihara N, Makita N et al. Variants in the *SCN5A* Promoter Associated With Various Arrhythmia Phenotypes. *J Am Heart Assoc* 5(9):e003644, 2016. 10.1161/JAHA.116.003644
16. Okata S, Makita N et al. Embryonic type Na⁺ channel beta-subunit, *SCN3B* masks the disease phenotype of Brugada syndrome. *Sci Rep* 6:34198, 2016. 10.1038/srep34198
17. Ishikawa T, Makita N et al. Inherited bradyarrhythmia: A diverse genetic background. *J Arrhythm* 32(5):352-358, 2016. 10.1016/j.joa.2015.09.009
18. Daumy X, Makita N et al. Targeted resequencing identifies TRPM4 as a major gene predisposing to progressive familial heart block type I. *Int J Cardiol* 207:349-358, 2016. 10.1016/j.ijcard.2016.01.052
19. Nademanee K, Makita N et al. Fibrosis, Connexin-43, and Conduction Abnormalities in the Brugada Syndrome. *J Am Coll Cardiol* 66(18):1976-1986, 2015. 10.1016/j.jacc.2015.08.862
20. Maharani N, Makita N et al. Molecular Mechanisms Underlying Urate-Induced Enhancement of Kv1.5 Channel Expression in HL-1 Atrial Myocytes. *Circ J* 79(12):2659-2668, 2015. 10.1253/circj.CJ-15-0416
21. Ishikawa T, Makita N et al. Novel mutation in the alpha-myosin heavy chain gene is associated with sick sinus syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 8(2):400-408, 2015. 10.1161/CIRCEP.114.002534
22. Hayashi K, Makita N et al. Functional Characterization of Rare Variants Implicated in Susceptibility to Lone Atrial Fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 8(5):1095-1104, 2015. 10.1161/CIRCEP.114.002519
23. Harrell DT, Makita N et al. Genotype-dependent differences in age of manifestation and arrhythmia complications in short QT syndrome. *Int J Cardiol* 190:393-402, 2015. 10.1016/j.ijcard.2015.04.090

[学会発表](計 28 件)

1. Makita N. Comprehensive Analyses Using Functional Evaluation and Whole-exome Sequencing to Decipher the Genetic Predispositions for Sudden Death in Brugada Syndrome. 第 83 回日本循環器学会学術集会. 横浜, 2019.
2. Yamazaki M, Makita N et al. Torsadogenic Action Of Late Na⁺ Current In Experimental Electrical Storm. The 39th Heart Rhythm Society Scientific Sessions. Boston, USA, 2018.
3. Yamamoto Y, Makita N et al. Single Cell Electrophysiological Analysis of Human iPSC Cell-Derived Cardiomyocytes Generated from Long-QT Syndrome Patients Carrying a *CALM2* Mutation Using a Membrane Voltage Imaging System. The 11th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session. Taipei, 2018.
4. Wijeyeratne Y, Makita N et al. Duration Predicts Events In Caucasians With E1784K-*SCN5A*: The E1784K International Consortium. The 39th Heart Rhythm Society Scientific Sessions Boston, USA, 2018.
5. Tsuji Y, Makita N et al. Mechanisms of Electrical Storm Associated With QT Prolongation: Successful Mapping of Torsades de Pointes in Rabbits. American Heart Association Annual Scientific Sessions 2018. Chicago, USA, 2018.
6. Makita N. Pathophysiology of Inherited Arrhythmias Associated with Ca Handling Abnormality. The 65th Annual Meeting of the Japan Heart Rhythm Society. Tokyo, Japan, 2018.
7. Makita N. Clinical and Genetic Basis of Calmodulinopathy. The 11th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session. Taipei, 2018.
8. Makita N. Novel Arrhythmia Syndrome Associated with Gap Junction Mutations. The 11th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session. Taipei, 2018.
9. Makita N. Atrial Conduction Defects Caused by a Connexin45 Mutation. The 11th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session. Taipei, 2018.
10. Makita N. Genotype-Dependent Differences in Short QT Syndrome. The 11th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session. Taipei, 2018.
11. Kashiwa A, Makita N et al. Mutation Hot-spot-based Risk Stratification In Long QT Syndrome Type 1: Data From A Nationwide Japanese LQT Registry. The 39th Heart Rhythm Society Scientific Sessions Boston, USA, 2018.
12. Ishikawa T, Makita N et al. Rare Coding Variants in Genes Other Than *SCN5A* Are Minimal Genetic Burden on the Prognosis of Brugada Syndrome. The 65th Annual Meeting of the Japan Heart Rhythm Society. Tokyo, 2018.
13. Gray B, Makita N et al. Lack Of Genotype-phenotype Correlation In Brugada Syndrome And Sudden Arrhythmic Death Syndrome Families With Reported Pathogenic *SCN1B* Variants. The 39th Heart Rhythm Society Scientific Sessions. Boston, USA, 2018.
14. Yokoi F, Makita N et al. IL-cis-Diltiazem Ameliorates Impaired Calcium Channel Inactivation in a Patient-Specific Stem Cell Model of Long-QT Syndrome with a Calmodulin Mutation. The 10th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session. Yokohama, Japan, 2017.
15. Yamamoto Y, Makita N et al. *CALM2*-D134H Mutation Associated With Long-QT Syndrome Delayed Inactivation of L-type Ca²⁺ Currents in Human iPSC Cells Derived Cardiomyocytes. American Heart Association Annual Scientific Session 2017. Anaheim CA, USA, 2017.
16. Nishiuchi S, Makita N et al. Gene-Based Risk Stratification for Cardiac Disorders in *LMNA* Mutation Carriers. The 10th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session. 横浜, 2017.

17. Nishiuchi S, Makita N et al Gene-Based Risk Stratification for Cardiac Disorders in *LMNA* Mutation Carriers in Japan. American Heart Association Annual Scientific Session 2017. Anaheim CA, USA, 2017.
18. Makita N, Seki A, Ishikawa T et al. *De novo* and Familial Connexin45 Mutant R75H Causes Progressive Atrioventricular Block Associated with Craniofacial and Dentodigital Dysmorphisms. Printemps de la Cardiologie Recherche Fondamentale et Clinique. La Cité des Congrès, Nantes, France, 2017.
19. Makita N. Genetic and Biophysical Basis of Calmodulinopathy, and Functional Rescue by Genome-Editing in Patient-Derived iPSC Cardiomyocytes. 20th International Symposium on Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease. Awaji, Hyogo, 2017.
20. Makita N. Genetic Mutation of Brugada Syndrome. Heart Rhythm Society Scientific Sessions. Chicago, USA, 2017.
21. Makita N. Brugada Syndrome: Basic and Clinical Updates, Advancement of Basic Research. 13th Annual Congress European Cardiac Arrhythmia Society. Rome, 2017.
22. Lahrouchi N, Makita N et al. Multinational genome-wide association study in long QT syndrome identifies a role for common genetic variation in disease susceptibility and points to a polygenic architecture in mutation-negative cases. Heart Rhythm Society Scientific Sessions. Chicago, USA, 2017.
23. Kimoto H, Makita N et al. Mutation in L-type Calcium Channel Cav1.3 (*CACNA1D*) Underlying a Consanguineous Family Associated with Congenital AV Block and Deaf-Blindness. The 10th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session. Yokohama, Japan, 2017.
24. Yoshinaga M, Makita N et al. ECG Screening of 1-month-old Infants May Prevent Out-of-hospital Cardiac Arrest in Infancy. American Heart Association Scientific Meeting 2016. New Orleans Convention Center, 2016.
25. Makita N. Genetic Background of Inherited Bradyarrhythmia. Korean Heart Rhythm Society 8th Annual Scientific Session. KINTEX, Korea, 2016.
26. Makita N. Overview of Genes Related to Cardiac Conduction. Korean Heart Rhythm Society 8th Annual Scientific Session. KINTEX, Korea, 2016.
27. Crotti L, Makita N. International Calmodulinopathy Registry (ICaMR). American Heart Association's Scientific Sessions. New Orleans, USA, 2016.
28. Makita N. SCN5A and ventricular arrhythmias. Asian Pacific Heart Rhythm Society. Melbourne, Australia, 2015.

〔図書〕(計 9件)

1. 蒔田直昌. 心電図 標準生理学 (医学書院, 東京) 本間研一編 9thEd p1172, 2019.
2. 辻幸臣, 蒔田直昌. 不整脈の発生機序 循環器内科専門医バイブル (中山書店, 東京) p 376, 2018.
3. 石川泰輔, 蒔田直昌. QT 短縮症候群: 致死性イベントのリスクが高い. 循環器科の心電図: ECG for Cardiologists(南江堂, 東京) p 215, 2018.
4. 石川泰輔, 蒔田直昌. 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 -. 池田隆徳・高橋尚彦・清水渉編 (南江堂, 東京), pp 82-85, 2015.
5. 蒔田直昌. 早期再分極 (J波) 症候群の遺伝子解析 ~ 危険なJ波は見極められるか? ~. 不整脈症候群 - 遺伝子変異から不整脈治療を捉える -, 池田隆徳・高橋尚彦・清水渉編(南江堂, 東京), pp 116-120, 2015.
6. 蒔田直昌. 遺伝子解析が有効な不整脈疾患は?. 不整脈診療クリニカルクエスチョン 200, 平尾見三編 (診断と治療社, 東京), pp 162-163, 2015.
7. 蒔田直昌. Progressive cardiac conduction disturbance (PCCD)とは?. 不整脈診療クリニカルクエスチョン 200, 平尾見三編 (診断と治療社, 東京), pp 164-165, 2015.
8. 蒔田直昌. QT 短縮症候群とは? 不整脈診療クリニカルクエスチョン 200, 平尾見三編(診断と治療社, 東京), pp 166-167, 2015.
9. 蒔田直昌. 不整脈のゲノムワイド解析はどこまで進んでいる?. 不整脈診療クリニカルクエスチョン 200, 平尾見三編 (診断と治療社, 東京), pp 167-168, 2015.

〔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)研究分担者

研究分担者氏名: 吉浦 孝一郎

ローマ字氏名: YOSHIURA, Koh-ichiro

所属研究機関名: 長崎大学

部局名：原爆後障害医療研究所
職名：教授
研究者番号（8桁）：00304931

研究分担者氏名：渡邊 泰秀
ローマ字氏名：WATANABE, Yasuhide
所属研究機関名：浜松医科大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：50305380

研究分担者氏名：牧山 武
ローマ字氏名：MAKIYAMA, Takeru
所属研究機関名：京都大学
部局名：医学研究科
職名：助教
研究者番号（8桁）：30528302

(2)研究協力者

研究協力者氏名：石川 泰輔
ローマ字氏名：ISHIKAWA, Taisuke