

令和元年6月24日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09111

研究課題名(和文) 遺伝性洞性徐脈の新規因子同定および予防医学への応用

研究課題名(英文) Identification of novel factor in hereditary sinus bradycardia and its application to preventive medicine

研究代表者

山崎 悟 (Satoru, Yamazaki)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：70348796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：心機能にとって、正常な心拍数とリズムは不可欠である。刺激伝導系におけるインパルス発生あるいは伝播の障害は、徐脈性不整脈を引き起こす。本研究においては、遺伝性洞性徐脈家系の解析により、アセチルコリン活性化カリウムチャネル(IKACHチャネル)をコードするKCNJ3の新規変異を明らかにした。この変異は、Gタンパク質共役型受容体刺激がない場合でも、基底電流を増加させることによってIKACHチャネル機能の異常活性を引き起こした。選択的IKACHチャネル遮断薬NIP-151は、活性の増加を抑制し、ヒト変異を持つゼブラフィッシュにおける徐脈性不整脈の表現型を改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性徐脈性不整脈の新たな原因として、IKACHチャネルの新規遺伝子変異を同定し、本チャネルの異常活性化が徐脈性不整脈の原因となることを見出した。本チャネルの選択的阻害薬は異常活性化を示す変異型チャネルに対しても高い阻害活性を示し、同チャネル変異を導入した疾患モデル動物においても有効性を示したことから、徐脈性不整脈に対する新規の分子標的治療薬になり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Normal heart rate and rhythm are essential for proper heart function. As disorders of impulse generation and/or propagation in the cardiac conduction system culminate in symptomatic, life-threatening bradyarrhythmias, the ion channels responsible for these phenomena represent promising therapeutic targets. We describe a family affected with hereditary sinus bradycardia. Genetic analysis revealed a novel mutation in KCNJ3, which encodes a subunit of the acetylcholine-activated potassium channel (IKACH channel). The mutation caused a gain of IKACH channel function by increasing the basal current, even in the absence of G protein-coupled receptor stimulation. The selective IKACH channel blocker NIP-151 repressed the current increase and improved all bradyarrhythmia phenotypes in zebrafish harbouring the mutation. We thus identified the KCNJ3 mutation as responsible for these bradyarrhythmias and propose that selective IKACH channel blockers may be a valuable therapeutic approach.

研究分野：循環器内科学

キーワード：臨床遺伝 洞性徐脈 ゲノム 循環器 刺激伝導組織

1. 研究開始当初の背景

循環調節系は進化の過程で培われてきたシステムであり、ペースメーカーを担う洞結節は恒常性維持の為に不可欠である。心臓刺激伝導系は、洞結節で発生する周期的な細胞電気興奮(活動電位)を隣接する心筋細胞群に次々に伝播させ、心臓全体を拍動させるという重要な役割を担っている。心拍数をつかさどる洞結節や房室結節などの刺激伝導系を構成する細胞の機能的破綻は洞性徐脈を引き起こし、心拍出量が低下することによる労作時の息切れや身体活動度の低下、脳虚血による失神等の重篤な症状をもたらす。このような徐脈性不整脈に対しては現在のところ、外科的なペースメーカー植え込み術が標準治療であり、徐脈の病態分子機序に基づいた長期的に服用可能な治療薬は存在しない。現在までに遺伝性の徐脈性不整脈の原因遺伝子として、一部の家系で過分極性陽イオンチャンネル遺伝子である HCN4、ナトリウムチャンネル遺伝子である SCN5A、核膜タンパク質遺伝子である LMNA と EMD、およびギャップ結合タンパク質遺伝子である Cx40 と Cx43 などに変異が見出されているものの、原因については現在まで明らかになっておらず、厚労省の難治性疾患克服研究事業の疾患にも指定されており、そのメカニズムの解明は医学的見地のみならず社会的にも急務である。

2. 研究の目的

そこで本研究では、遺伝性徐脈性不整脈の家系において原因遺伝子変異を同定し、その分子機能解析を行い、さらにモデル動物を作製し病態再現性を見ることを主目的とする。続いて、作成されたモデル動物の系を用いて、標的分子に対する選択性と高親和性を有する新規化合物の薬理作用を評価することも併せて行った。

3. 研究の方法

(1) ゲノム解析および遺伝学的な解析による原因遺伝子の同定

遺伝性徐脈性不整脈(洞不全症候群、徐脈性心房細動、および房室ブロック)の診断がついた家系を対象に、各検体の血液より genomic DNA を抽出した。続いて、家系構成員の一部について、全エクソーム解析を行った。フィルタリングは、次のようなカテゴリーで行った。(a)ヘテロで存在するバリエーション、(b) exon 内に存在するバリエーション、(c)同義置換以外の変異を有するバリエーション、(d)dbSNP135 のような多型データベースにおいて、Minor アレル頻度が 0.1% 以下であるもの。一方、遺伝学的解析については、構成員全員(罹患、非罹患を含む 13 人)を用いて行った。実際には、すべての染色体に配置されている多型性マーカーを typing し、組み換えの情報を得た。なお、この研究については共同研究を行った大阪大学などで倫理計画が承認されている。

(2) 電気生理学的なアプローチによるチャンネルの機能解析

ゲノムおよび遺伝学的な解析により明らかとなった原因遺伝子の変異と実際の機能の相関を解析するために、電気生理学的な解析を行った。

a. アフリカツメガエルの未受精卵を調整し、電気生理学的な解析の材料とした。実際には、ヒトの KCNJ3 (野生型および N83H)、KCNJ5 などから cRNA を合成し、アセチルコリン受容体 (m_2R) の cRNA とともに、受精卵に導入した。電流の解析は、二電極膜電位固定法によって行い、得られた電流値の解析は、Clampfit によって行った。なお、アセチルコリン (ACh) や Ba²⁺ は灌流液に流す形で添加し、ACh はチャンネルの活性化 (total 電流の測定) および Ba²⁺ は、発現しているカリウム電流を完全に抑制するために使用した。

b. シングルチャンネルの電流を測定するために、以下のような方法を用いた。すなわち、ヒトの KCNJ3 (野生型および N83H)、KCNJ5 を pcDNA にクローニングし、HEK293T にトランスフェクションした。まず、Whole-cell 電流の記録は、Axopatch200B を用いることにより -100 mV の電位に固定した状態で行った。また、single チャンネルの記録の場合には inside-out パッチ膜を形成し、ATP (2 mM) および GTP S (10 μM) を含む溶液中で記録を行った。

(3) ゼブラフィッシュを用いた病態再現性の確認

得られた変異の生体レベルにおける病態再現性を調べるために、ヒト遺伝子を導入したトランスジェニックゼブラフィッシュを作成した。実際には、ゼブラフィッシュの心房由来ミオシン重鎖プロモーター下流に、ヒト KCNJ3 (Kir3.1-WT or -N83H)、ヒト KCNJ5、およびレポーターとして mCherry を 2A によって連結し、3つの遺伝子産物を同時に発現する系を構築した。続いて、トランスポゼース 2 (以下、Tol2) とともに上記のコンストラクトをゼブラフィッシュ受精卵に導入した (Tol2 システムを用いると DNA の宿主染色体への挿入が促進され、高い導入効率を得られる)。mCherry の発現を指標にスクリーニングを行い、複数の founder を得ることができた。続いて、心臓の機能を測定するために得られた founder と心筋に GFP を発現する hspGFF3A と系統のゼブラフィッシュを交配し、蛍光顕微鏡下でイメージングを行った。

(4) アフリカツメガエル未受精卵およびゼブラフィッシュ embryo における NIP-151 処理
 KCNJ3 への阻害剤の効果を見るために、NIP-151 を 0.001、0.01、0.03、0.1、1 および 10 μ M の濃度で処理した。実際の阻害効果は、アフリカツメガエル未受精卵の場合は、二電極膜電位固定法により電流を測定し、ゼブラフィッシュ embryo においては、心臓のイメージングにより、解析した。

4. 研究成果

(1) 徐脈性不整脈家系における原因遺伝子の同定

遺伝性徐脈性不整脈（洞不全症候群、徐脈性心房細動、および房室ブロック）のいくつかの家系について、最初のアプローチとして全エクソーム解析を行った。ある家系（家系 A）については、候補遺伝子を 8 つまで絞り込むことができた。そして co-segregation 解析により縛りこまれたバリエーションの継承は確認することができたが、本家系ではこれ以上の情報を絞り込むことができなかった。この段階で考えられたことは、家系の構成員のすべての情報を使えただけではないので、真の原因となるバリエーションとそうでない領域のバリエーションが分離できないということである。それゆえ、並行して解析していた別家系（家系 B）については、少し別のアプローチを試みた。すなわち、構成員が 13 人であり、3 世代にまたがる家系であったので、その組み換え情報をフルに使うために、得られたすべての検体を対象に、マイクロサテライトマーカーを用いて連鎖解析を行った。その結果、L LOD score 2.709 となり、2 番染色体の D2S112 と D2S2330 の領域 [約 48.3 Mb]、および 14 番染色体の pter と D14S288 の領域 [約 44.1 Mb] の 2 か所に候補領域が絞られた（図 1）。この結果とエクソーム解析の結果を合わせることで、最終的に、その原因として KCNJ3 遺伝子に新規変異を同定した（c.247A>C, p.N83H）。

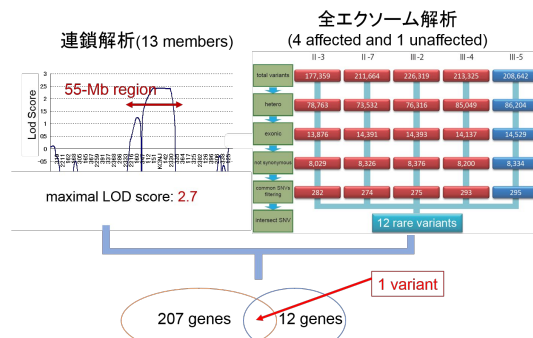


図1. 遺伝性徐脈性不整脈家系における原因遺伝子の解析（連鎖解析および全エクソーム解析による複合解析）

(2) KCNJ3 変異体における電気生理学的解析

KCNJ3 の遺伝子産物である Kir3.1 蛋白質は、KCNJ5 によってコードされる Kir3.4 蛋白質と共にヘテロ四量体としてアセチルコリン活性化カリウムチャンネル（IKACH チャンネル）を構成する。IKACH チャンネルは心臓の洞結節、心房筋および房室結節に発現しており、副交感神経刺激によるアセチルコリン（ACh）のムスカリン M2 受容体への結合を介してチャンネルが活性化され、心拍数を低下させる役割を担っている。アフリカツメガエル卵母細胞に KCNJ3 と KCNJ5 の cRNA をインジェクションすることにより IKACH チャンネルを発現させ、二電極膜電位固定法によって変異型 IKACH チャンネルの電気生理学的特性を解析した。その結果、野生型 IKACH チャンネルは ACh 非刺激時の電流量は小さく ACh 刺激によってチャンネルが活性化され電流量が増大するが、変異型 IKACH チャンネルは ACh 非刺激時の電流量が既に大きく、変異の存在によるチャンネルの異常活性化が考えられた（図 2）。続いて、この過剰な電流のメカニズムの解明を行うために、パッチクランプ法を用いてシングルチャンネルの電流を測定した。その結果、野生型に対して変異体では、1 つのチャンネルに流れる電流量は変化しないが、チャンネルの開閉時間が延長していることが、明らかになった（図 3）。

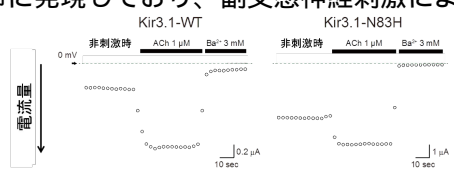


図2. 原因遺伝子KCNJ3によってコードされるKir3.1における二電極膜電位固定法におけるマクロな電流特性

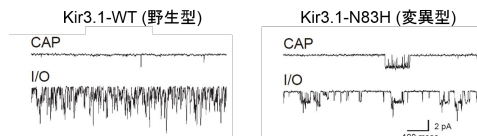


図3. Kir3.1におけるパッチクランプ法におけるsingleチャンネルの電流特性

(3) KCNJ3 変異体におけるモデル動物の病態再現性

さらに、同定された KCNJ3 の変異が病態再現性をもつかどうかを調べるために、ヒトの変異を導入したトランスジェニックゼブラフィッシュを作成した（導入した遺伝子は、心房筋に特異的に発現するように操作し、mCherry という蛍光タンパクの発現をモニターする形で、確認した）。実際には、ゼブラフィッシュの embryo（3 日後胚）を用いて、心拍数の測定を行った。

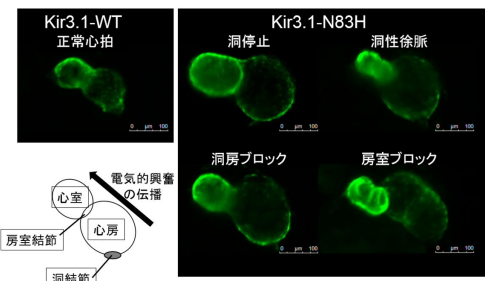


図4. ヒトKir3.1を発現した動物モデル(トランスゼブラフィッシュ)における病態再現性

その結果、ゼブラフィッシュの野生型に対して、ヒトの変異を導入したゼブラフィッシュでは心臓が肥大し、心拍数が減少した。一方、ヒトの正常遺伝子を導入したゼブラフィッシュでは、心拍数に変化はなかった。なお、神経系に影響は見られなかったため、導入した変異遺伝子の効果は心臓に特異的であり、病態は再現される結果であった(図4)。

(4) 選択的阻害剤 NIP-151 における薬理的解析

次に、IKACH チャンネルに対して選択的阻害活性を持つ化合物 NIP-151 に着目し、薬理的解析を行った。また、疾患モデル動物における生体内薬効解析を行うため、NIP-151 投与前後での心拍解析を行った。電気生理学的実験の結果、野生型 IKACH チャンネルは ACh 非刺激時の電流量は小さく ACh 刺激によってチャンネルが活性化され電流量が増大するが、変異型 IKACH チャンネルは ACh 非刺激時の電流量が既に大きく、変異の存在によるチャンネルの異常活性化が考えられた。NIP-151 は野生型のみならず変異型 IKACH チャンネルに対しても高い親和性と濃度依存性の阻害効果を認めた NIP-151 水溶液(100 nM) 中に入れて心拍解析を行ったところ、変異型ゼブラフィッシュの心拍数を有意に上昇させ、徐脈性不整脈を改善させた。

遺伝性徐脈性不整脈の新たな原因として、IKACH チャンネルの新規遺伝子変異を同定し、本チャンネルの異常活性化が徐脈性不整脈の原因となることを見出した。本チャンネルの選択的阻害剤は異常活性化を示す変異型チャンネルに対しても高い阻害活性を示し、同チャンネル変異を導入した疾患モデル動物においても有効性を示したことから、徐脈性不整脈に対する新規の分子標的治療薬になり得ることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

1. Yamada N, Asano Y, Fujita M, Yamazaki S(*corresponding author), Inanobe A, Matsuura N, Kobayashi H, Ohno S, Ebana Y, Tsukamoto O, Ishino S, Takuwa A, Kioka H, Yamashita T, Hashimoto N, Zankov DP, Shimizu A, Asakura M, Asanuma H, Kato H, Nishida Y, Miyashita Y, Shinomiya H, Naiki N, Hayashi K, Makiyama T, Ogita H, Miura K, Ueshima H, Komuro I, Yamagishi M, Horie M, Kawakami K, Furukawa T, Koizumi A, Kurachi Y, Sakata Y, Minamino T, Kitakaze M, Takashima S. Mutant KCNJ3 and KCNJ5 Potassium Channels as Novel Molecular Targets in Bradyarrhythmias and Atrial Fibrillation. *Circulation*. 2019 Apr 30;139(18):2157-2169. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036761. 査読有
2. Hodatsu A, Fujino N, Uyama Y, Tsukamoto O, Imai-Okazaki A, Yamazaki S, Seguchi O, Konno T, Hayashi K, Kawashiri MA, Asano Y, Kitakaze M, Takashima S, Yamagishi M. Impact of cardiac myosin light chain kinase gene mutation on development of dilated cardiomyopathy. *ESC Heart Fail*. 2019 Apr;6(2):406-415. doi: 10.1002/ehf2.12410. 査読有
3. Ito S, Asakura M, Liao Y, Min KD, Takahashi A, Shindo K, Yamazaki S, Tsukamoto O, Asanuma H, Mogi M, Horiuchi M, Asano Y, Sanada S, Minamino T, Takashima S, Mochizuki N, Kitakaze M. Identification of the Mtus1 Splice Variant as a Novel Inhibitory Factor Against Cardiac Hypertrophy. *J Am Heart Assoc*. 2016 Jul 6;5(7). pii: e003521. doi: 10.1161/JAHA.116.003521. 査読有
4. Masumura Y, Higo S, Asano Y, Kato H, Yan Y, Ishino S, Tsukamoto O, Kioka H, Hayashi T, Shintani Y, Yamazaki S, Minamino T, Kitakaze M, Komuro I, Takashima S, Sakata Y. Btg2 is a Negative Regulator of Cardiomyocyte Hypertrophy through a Decrease in Cytosolic RNA. *Sci Rep*. 2016 Jun 27;6:28592. doi: 10.1038/srep28592. 査読有
5. Kotani Y, Morito D, Yamazaki S, Ogino K, Kawakami K, Takashima S, Hirata H, Nagata K. Neuromuscular regulation in zebrafish by a large AAA+ ATPase/ubiquitin ligase, mysterin/RNF213. *Sci Rep*. 2015 Nov 4;5:16161. doi: 10.1038/srep16161. 査読有
6. Takahashi A, Ihara M, Yamazaki S, Asanuma H, Asakura M, Kitakaze M. Impact of Either GLP-1 Agonists or DPP-4 Inhibitors on Pathophysiology of Heart Failure. *Int Heart J*. 2015;56(4):372-6. doi: 10.1536/ihj.15-028. 査読有
7. Ihara M, Asanuma H, Yamazaki S(*corresponding author), Kato H, Asano Y, Shinozaki Y, Mori H, Minamino T, Asakura M, Sugimachi M, Mochizuki N, Kitakaze M. An interaction between glucagon-like peptide-1 and adenosine contributes to cardioprotection of a dipeptidyl

peptidase 4 inhibitor from myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015 May 15;308(10):H1287-97. doi: 10.1152/ajpheart.00835.2014 査読有

8. Yan Y, Tsukamoto O, Nakano A, Kato H, Kioka H, Ito N, Higo S, Yamazaki S, Shintani Y, Matsuoka K, Liao Y, Asanuma H, Asakura M, Takafuji K, Minamino T, Asano Y, Kitakaze M, Takashima S. Augmented AMPK activity inhibits cell migration by phosphorylating the novel substrate Pdlim5. *Nat Commun*. 2015 Jan 30;6:6137. doi: 10.1038/ncomms7137. 査読有

9. Hayashi T, Asano Y, Shintani Y, Aoyama H, Kioka H, Tsukamoto O, Hikita M, Shinzawa-Itoh K, Takafuji K, Higo S, Kato H, Yamazaki S, Matsuoka K, Nakano A, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Goto Y, Ogura T, Kitakaze M, Komuro I, Sakata Y, Tsukihara T, Yoshikawa S, Takashima S. Higd1a is a positive regulator of cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Feb 3;112(5):1553-8. doi: 10.1073/pnas.1419767112. 査読有

〔学会発表〕(計8件)

1. 山崎 悟、山田憲明、朝野仁裕、北風 政史、高島 成二

家族性洞結節および心房徐脈性不整脈における治療標的を提供するアセチルコリン活性化カリウムチャンネルにおける病原性突然変異, 第95回日本生理学会大会(2018年:招待講演)、高松

2. 小林 香織、今井 敦子、山崎 悟、菊地 正隆、足尾 勉、上條 憲一、松村 泰志、中谷 明弘

エクソーム解析基盤を用いた日本人変異解析における解析手法の検証と可視化、第40回日本分子生物学会年会(2017年)、神戸

3. 清水秀二、山崎 悟、川田 徹、秋山 剛、羽山陽介、James T Pearson、宍戸稔聡、杉町勝
再灌流は、虚血心筋での血管内皮細胞特異的 microRNA 分泌を亢進する、第110回日本生理学会近畿生理学談話会(2017年)、神戸

4. S. Shimizu, S. Yamazaki, T. Akiyama, T. Kawada, J.T. Pearson, T. Shishido, M. Sugimachi
Cardiac microdialysis enables us to monitor myocardial interstitial microRNA levels in an in-vivo beating rat heart during ischaemia/reperfusion ESC Congress2017(2017年:国際学会) スペイン

5. 山崎悟、伊原まどか、浅沼博司、北風政史

DPP4 阻害薬 alogliptin は、アデノシン依存性のメカニズムを介して、虚血/再灌流障害を抑制する、第38回日本循環制御医学会総会・学術集会(2017年)、大阪

6. T. Konno, A. Hodatsu, O. Seguchi, S. Yamazaki, A. Imai, Y. Uyama, O. Tsukamoto, Y. Asano, S. Takashima, M. Yamagishi. Truncation Mutation in Gene Encoding Cardiac Specific Kinase X Causes Dilated Cardiomyopathy. (2016年) 札幌

7. S. Ito, M. Asakura, K.D. Min, K. Shindo, M. Imazu, H. Fukuda, H. Chung, S. Yamazaki, Asanuma H, Kitakaze M. Mtus1A Variant Suppresses Cardiac Hypertrophy through the Inhibition of ERK Signaling Activated by ROS Production 第80回日本循環器学会学術総会(2016年) 仙台

8. N. Yamada, Y. Asano, T. Minamino, S. Yamazaki, S. Ono, N. Hashimoto, T. Yamashita, M. Horie, Y. Kurachi, I. Komuro, M. Kitakaze, Y. Sakata, S. Takashima Kir3.1 channel mutation, a novel therapeutic target for familial sinus bradycardia and atrial fibrillation. 第80回日本循環器学会学術総会(2016年) 仙台

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 北風 政史

ローマ字氏名: KITAKAZE MASAFUMI

所属研究機関名: 国立研究開発法人国立循環器病研究センター

部局名: 研究開発基盤センター

職名：部長

研究者番号（8桁）：20294069

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。