

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19277

研究課題名(和文) 心臓性突然死におけるSCN5A遺伝子の変異解析とその応用

研究課題名(英文) Mutational analysis of SCN5A gene in sudden cardiac death and its application

研究代表者

村上 千香子 (Murakami, Chikako)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：30433717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：法医学で扱う突然死症例のうち遺伝性致死性不整脈などの機能的な死亡では解剖において形態学的所見は乏しく診断に苦慮する事例がある。遺伝性不整脈の病態を解明するには家系・症例を多数集積する必要がある。本教室では心臓イオンチャネル遺伝子の変異解析を行い報告しているが、本研究ではSCN5A遺伝子の変異解析を行い遺伝子診断の有用性について検討を行った。急性心機能不全と診断された症例および拡張型心筋症例各1例においてp.Phe532Cysが検出された。この変異は病原性変異が強く示唆されており致死性不整脈が引き起こされた可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In most cases of sudden death, cause and manner of death can be established, with many attributable to cardiac abnormalities at autopsy. A significant number of sudden cardiac deaths, however, particularly in young people, remains unexplained following a comprehensive medicolegal investigation, including autopsy and laboratory tests.

In this study, comprehensive screening of cardiac ion channel gene, SCN5A were performed in sudden cardiac death. One mutation(p.Phe532Cys) was detected in only acute heart failure and dilated cardiomyopathy cases. This mutation was analyzed by using Polyphen2. p.Phe532Cys had Polyphen2 score of 0.999 (Probably damaging). It would be desirable to survey other disease-causing genes to determine a more accurate prevalence of gene mutations in sudden cardiac death.

研究分野：法医学

キーワード：SCN5A 心臓性突然死 心臓イオンチャネル遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

社会の高齢化に伴い高齢者の突然死が増加している現状をふまえ、北里大学医学部法医学教室は形態学的研究を中心として内因性突然死の病態解明を行ってきた。突然死とは、瞬間死あるいは急性症状の発現後 24 時間以内の死亡で、交通事故等の外因死を除いた自然死のことであり、その中でも心臓性突然死の占める割合は約 50%と多く、その研究は予防医学的にも大きな展望が望まれている。突然死の死因、病態を解明するには解剖を積極的に行う必要があるが、異状死体の取り扱い方は全国各地で異なり、また扱いに関する法規が異なっているため十分な調査・研究ができないのが現状である。

従来、病気は病態を手がかりとして診断されていたが、遺伝子操作の技法の進歩によって、一部の病気については発病の主要な原因になった遺伝子の構造変化を明らかにすることによって診断できるようになり、その結果、遺伝子異常により生じる循環器疾患も複数見つかってきている。遺伝性致死性不整脈は若年者に突然死を惹起する予後不良の疾患であり、中でも先天性 QT 延長症候群(LQTS)は心筋活動電位の形状や伝搬に異常をきたし致死性不整脈として研究が進んでおり、現在までに 13 個の原因遺伝子が同定されている。しかし、それ以外においては依然不明な点が多く、分子病態の解明が待たれるところである。

## 2. 研究の目的

これまで当教室では心臓性突然死症例において、ご家族の同意のもと原因遺伝子の検索に取り組んでおり、LQTS の原因遺伝子とし

て同定されている KCNQ1 遺伝子、SCNH2 遺伝子に新たな遺伝子変異を発見している。今回 LQTS の原因遺伝子として同定されている SCN5A 遺伝子について変異解析を行い心臓性突然死の実態を解明する。

## 3. 研究の方法

当教室において解剖された心臓性突然死症例について SCN5A 遺伝子のダイレクトシーケンス反応を行い、遺伝子変異解析を行うとともに遺伝子解析による確定診断の可能性について検討を行った。

### (1) DNA 試料

当教室にて解剖され、心臓に明らかな器質的病変が認められず、急性心機能不全(AHI)と診断された心臓性突然死症例 23 例を対象とした。また、その他の心疾患として心重量が 450g 以上あり、かつ剖検時に求心性あるいは拡張性心肥大の所見が認められた心肥大(CH) 46 例、肥大型心筋症(HCM) 19 例、拡張型心筋症(DCM) 22 例および不整脈原性右室心筋症(ARVC) 3 例を対象とした。血液試料から Quick Gene-800 (FUJIFILM) を用いて DNA 抽出を行った。

### (2) 解析方法

SCN5A の Exon2~28 について NCBI の Reference (NG\_008934.1)をもとに Primer を作製し、増幅は 10 $\mu$ g の DNA 0.5 $\mu$ l を鋳型として、10 $\mu$ M Forward Primer 1.0 $\mu$ l、10 $\mu$ M Reverse Primer 1.0 $\mu$ l、AmpliTaq Gold<sup>®</sup> 360 Master Mix 5.0 $\mu$ l を加え、Sterile Deionized Water で総量 10.0 $\mu$ l に調製したものを反応液とし、Veriti<sup>®</sup> Thermal Cycler (ThermoFisher)を用いて、Initial Step 95

10 分後, Denaturation 95 30 秒, Annealing 60~64 30 秒, Extension 72 1 分を 35 サイクル, Final Step 72 7 分で行った. PCR 産物は ExoSAP-IT (USB Products) 処理後、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher) を用いてダイレクトシーケンス反応を行った後、3130 Genetic Analyzer を用いて泳動および SeqScape® Ver2.5 を用いて塩基配列決定を行った。

#### 4. 研究成果

##### SCN5A 遺伝子

AH123 例、CH46 例、HCM19 例、DCM22 例および ARVC3 例について SCN5A 遺伝子の変異解析を行ったところ、検出された変異は 24 ケ所であり、そのうち多型は 10 ケ所であった (表 1、図 1)。

表 1 SCN5A 遺伝子変異解析結果

Location	Nucleotide alterations NM_196056.2	Amino acid alterations NP_932173.1	Cases	References
Exon 2	c.30C>T	p.Thr10=	control 1	*
Exon 2	c.87A>G	p.Ala29=	polymorphism	rs6599230
Intron 4	c.482+184G>A		polymorphism	rs6781731
Intron 6	c.612-86G>A		polymorphism	rs9656587
Intron 6	c.703+1G>A		ARVC 1	*
Intron 8	c.935-52C>T		HCM 1	rs369905933
Intron 9	c.999-28G>A		HCM 1	*
Intron10	c.1141-3C>A		polymorphism	rs41312433
Intron11	c.1339-24G>A		polymorphism	rs7428779
Exon 12	c.1595T>G	p.Phe532Cys	AHI 1, DCM 1	rs199473573
Exon 12	c.1673A>G	p.His558Arg	polymorphism	rs1805124
Intron13	c.1891-30G>A		DCM 1	*
Exon 18	c.3269C>T	p.Pro1090Leu	polymorphism	rs1805125
Exon 18	c.3285G>T	p.Trp1095Cys	CH 1	*
Exon 20	c.3578G>A	p.Arg1193Gln	polymorphism	rs41261344
Exon 20	c.3603C>T	p.Ile1201=	CH 1	*
Exon 20	c.3630C>T	p.Phe1210=	DCM(homo) 1	*
Intron23	c.3964-24G>C		CH 1	*
Intron24	c.4299+53T>C		polymorphism	rs41312393
Intron27	c.4813+24G>A		HCM 1, CH 2, ARVC1	rs45440596
Exon 28	c.5457T>C	p.Asp1819=	polymorphism	rs1805126
Exon 28	c.5775C>G	p.Ser1925=	DCM 1, CH 1, control 1	rs99687668
Exon 28	c.5851G>A	p.Val1951Met	HCM 1, CH 1	rs41315493
Exon 28	c.5963T>G	p.Leu1988Arg	CH 1, control 1	rs145009013

\*:今回新たに検出された変異

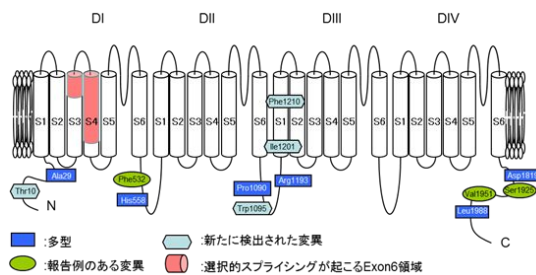


図 1 ナトリウムチャネル サブユニットにおける変異位置

今回新たに検出された変異は CH で 3 ケ所、CM で 4 ケ所、対照で 1 ケ所であった。AHI および DCM 各 1 例で検出された p.Phe532Cys はすでに報告があり、不整脈患者および Brugada 症候群患者各 1 例から検出されている。変異があった箇所の配列保存性や化学的な特徴、さらにタンパク質構造やドメイン情報をもとに変異がタンパク質の機能に及ぼす影響を数値化する公知の予測ツールである PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) を用いて p.Phe532Cys を解析したところ病原性変異が強く示唆される probably damaging (0.999) と判定された。したがって、AHI では c.1595T>G により致死性不整脈が引き起こされた可能性が考えられた。

また、CH1 例で検出された p.Trp1095Cys は報告例がなく、PolyPhen-2 により possibly damaging (0.651) と判定された。p.Trp1095Cys はドメイン同士を近づける働きがあるインタードメインリンカーに位置していることからタンパク質構造に変化がみられた可能性が考えられた。さらに DCM1 例で検出されたサイレント変異 p.Phe1210= はコドンが TTT から TTC に変化したことにより、翻訳効率が 20.3 から 17.6 と減少していた。本症例はホモ接合体であり、さらにサルコメア構成タンパクにアミノ酸変異を有していないことなどから、p.Phe1210= が何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

ARVC1 例に新たに検出された c.703+1G>A は Intron6 の 5' splice site に位置している。Exon6 は 141bp 下流にほぼ同じアミノ酸配列を持つ Exon が存在し、これら 2 つの Exon は選択的スプライシングにより isoform を形成

している(図2)。成人の心筋は Exon6b を所有している。今回、5' splice site に変異が認められたことで選択的スプライシング異常が起きた可能性もあり、mRNA の解析を加えて更なる検討が必要と考えられた。

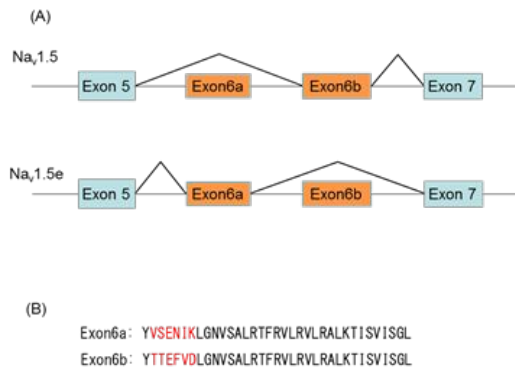


図2 (A) Exon6 の選択的スプライシングによる isoform

(B) Exon6a および 6b のアミノ酸配列

検出された多型について各症例と対照との間で有意差検定を行ったところ、p.Ala29= で DCM と AHI に、c.482+184G>A で CH に有意差が認められた(表2)。

表2 有意差検定結果

	Genotype frequency	Allele frequency	
p.Ala29=	P=0.01*	P=0.007*	DCM vs. control
p.Ala29=		P=0.039*	AHI vs. control
c.482+184G>A		P=0.049*	CH vs. control

\*: P<0.05

p.Ala29=の報告例では不整脈疾患との間に有意差が認められていないがAlaの翻訳効率が15.8から7.4と約半分に減少していることからタンパク質機能異常をきたしている可能性が考えられた。心不全が起こる際RBM25とLUC7L3の発現が増加し、これらの作用によりSCN5Aのスプライシング変化が起こり、SCN5Aバリエーションが増加することがわかっている。今回、心筋におけるこれらSCN5A

バリエーションの発現をmRNA(RT-PCR)で検討を行ったところ有意差は認められなかった。

法医学で扱う突然死症例は主として解剖所見から死因の特定がなされているが、不整脈などの機能的な死亡では解剖において形態学的所見は乏しく、また十分な医療情報が得られないこともあり、診断に苦慮する事例がある。解剖しても明らかな病変が認められない場合には遺伝子異常に基づく突然死も考慮しなければならない。遺伝子異常を解明することはその疾患を治療する上で重要な第一歩であり、治療に直結せずともその患者の予後推定や家族へのフィードバックが可能となり予防医学にも貢献するものと考えられる。今後、症例の死後経過時間も考慮に入れ、症例数を増やしてさらなる解析が必要であると考えられた。

## 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1件)

村上千香子、前田一輔、入江渉、大石桃子、佐々木千寿子、中丸尚美、中村茂基、栗原克由 心臓性突然死の遺伝子解析 -SCN5A 遺伝子の変異解析- 日本 DNA 多型 23 177-180 2015 査読有 DOI なし

### [学会発表](計1件)

前田一輔、村上千香子、入江渉、佐々木千寿子、中村茂基、佐藤文子、栗原克由 心筋症及び心肥大・拡張事例におけるラミンA/C遺伝子およびサイファー遺伝子

の変異解析 第 66 回日本法医学会九州  
地方集会 2016年10月14日～15日 久  
留米大学（福岡県久留米市）

〔図書〕(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

村上 千香子 (MURAKAMI, Chikako)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：30433717

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

### (4)研究協力者

( )