

令和元年6月25日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19373

研究課題名(和文) 難治性不整脈症候群におけるゲノム上の非翻訳領域の役割と機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of role and mechanism of untranslated region on genome in arrhythmia syndrome

研究代表者

八木原 伸江(Nobue, Yagihara)

新潟大学・医歯学総合病院・特任助教

研究者番号：70750347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：通常、遺伝子検査ではタンパク翻訳領域およびそれに隣接したイントロンの配列のみに限って行われる。しかし、このような従来の検査法では原因遺伝子に異常が同定されない症例も多い。本研究では、種々の不整脈症候群の症例を対象に、心筋のNaチャンネルのサブユニットであるSCN5Aのプロモーター領域の遺伝子検査を行った。同定されたvariantの機能解析を行い、いずれのvariantもプロモーター活性が低下することから、非翻訳領域のvariantが不整脈発症の一因である可能性が示唆された。さらに、次世代シーケンスの手法を用いて心筋に多く発現するイオンチャンネルのプロモーター領域の遺伝子検査を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、不整脈疾患の遺伝子検査は原因遺伝子のタンパク翻訳領域およびそれに隣接した非翻訳領域の一部に限局して施行されることが多かった。しかし、これらの領域に変異が同定されるのは、最も多いQT延長症候群でも70%程度、日本人を含めたアジア人に多く見られるBrugada症候群では20-30%程度であり、十分とはいえない。本研究では、原因遺伝子のプロモーター領域という、タンパク発現に大きく関与すると考えられる配列における変異を同定し、その機能解析を行うことにより、これまでの検査法では異常が同定されなかった症例においても不整脈発症の機序を解明する一助となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Genetic analysis is usually performed in the coding region and the contiguous sequence. However, patients with arrhythmia syndrome who identified some mutations in causal genes are rare. In a recent study, about 70-80% of the genome was shown to have biochemical functions. In the present study, we resequenced the promoter region of SCN5A, which encodes the cardiac sodium channel alpha subunit, in 1298 patients with various arrhythmias. Functional analysis of the promoter activity of identified variants decreased compared with the wild-type sequences.

研究分野：循環器

キーワード：遺伝子検査 非翻訳領域 不整脈

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

従来、遺伝性不整脈に対する遺伝子検査はタンパク翻訳領域およびそれらに隣接するイントロンのみを対象とすることが多かったが、既知の原因遺伝子に最も多く変異が同定される QT 延長症候群でも約 70%、日本人を含むアジア人に多く見られる Brugada 症候群では 20 - 30%程度であり、異常が同定されない症例は少なくない。また、タンパクをコードしている配列は、ゲノム上の 2%程度であるが、非翻訳領域の約 70%程度は何らかの機能を有していることが明らかとなっている。これらの事実を踏まえ、我々は、不整脈症候群の既知の原因遺伝子のプロモーター領域の変異が、不整脈発症に関与している可能性を検証することとした。

2. 研究の目的

(1) 特発性不整脈症候群の遺伝的背景としての非翻訳領域の役割の解明

不整脈症候群は遺伝性疾患であることが広く知られている。通常の遺伝子検査はタンパクに翻訳される領域のみを対象として行われ、非翻訳領域の検索は行われないことが多い。このため、心臓病の原因となる遺伝子変異のほぼ全ては、翻訳領域ないしは翻訳領域と非翻訳領域の境界に同定されてきた。これまでほとんど機能を有しないと考えられていたゲノム上の非翻訳領域が、近年その 70%程度の領域は何らかの機能を有することが明らかとなった。これは、様々な遺伝性疾患の原因のうち未解明である部分が、非翻訳領域に存在している可能性を示している。しかし、不整脈症候群の原因として非翻訳領域の役割を示した知見はほとんどない。本研究では、不整脈症候群の発症と非翻訳領域の異常との関連を明らかにすることを目的としている。

(2) Na⁺チャネル遺伝子 SCN5A の非翻訳領域と不整脈症候群

SCN5A は心筋の主要な Na⁺チャネルのサブユニットをコードしている遺伝子であり、様々な不整脈の原因遺伝子でもある。しかし、SCN5A が主要な原因遺伝子である Brugada 症候群においても SCN5A の変異は約 20%にしか同定されず、遺伝子変異が同定されない症例がほとんどである。そこで、本研究の 1 番目の目的は、様々な不整脈症候群における SCN5A のプロモーター領域や転写調節領域といった非翻訳領域の役割を検討することである。SCN5A のプロモーター領域の変異が、不整脈を発症させる機序を解明するためにプロモーターの機能解析を行う。また、様々な転写因子がプロモーターの活性を制御しているが、SCN5A と転写因子の関係は不明である。そこで本研究では、次世代シーケンサーを用いた ChIP-Seq 解析を行い、SCN5A のプロモーター領域に関係している転写因子を網羅的に検索する。

(3) 次世代シーケンサー法を応用した非翻訳領域の網羅的な遺伝子解析

遺伝子変異が様々な不整脈症候群を発症させる主な機序は、Na⁺チャネル、Ca²⁺チャネルないしは K⁺チャネルの機能異常である。本研究では、これらのイオンチャネル遺伝子の非翻訳領域の解析を行う。また ChIP-Seq 解析を用いて、イオンチャネルの非翻訳領域内に存在して、転写調節因子やその他のタンパクが直接の相互作用を起こす領域の検索を行う。

ゲノムの非翻訳領域には、遺伝子の発現を制御しているマイクロ RNA が存在していることが近年明らかになってきた。マイクロ RNA がイオンチャネルの発現量を変化させて不整脈の発症に関与している可能性があるが、このような検討はほとんどない。そこで本研究ではマイクロ RNA も解析対象に含める。

翻訳領域はゲノム上のわずか 2%程度であり、遺伝子の非翻訳領域は翻訳領域に比較して極めて多くの塩基配列を含んでいる。このため、従来から用いられてきた遺伝子解析法では、本研究が目的とする非翻訳領域の解析は困難である。そこで、近年開発された次世代シーケンサー法を応用した独自アッセイを構築して、様々なイオンチャネルの非翻訳領域と正常な心機能に関係する全てのマイクロ RNA の遺伝子解析を網羅的に行う。さらに培養細胞並びに遺伝子組み換えマウスを用いて、同定された変異が不整脈を発症させる機序を検討する。すなわち、本研究の 2 番目の目的は、非翻訳領域を網羅的に解析して不整脈症候群の新たな機序を解明することである。

さらに、本研究で得られた遺伝子解析と機能解析の結果は個々の症例に還元し、遺伝子型に基づく不整脈のリスク層別化と薬物療法の選択といった個別化医療に応用する。

3. 研究の方法

(1) 不整脈症候群症例の集積・遺伝的背景の解明

国内外の多施設の協力のもと、不整脈症候群の症例のデータを集積し、その遺伝的背景を解析する。洞不全症候群、心房細動、心臓伝導障害、Brugada 症候群、早期再分極症候群、特発性心室細動といった Na⁺電流の減少が主要な原因と考えられる不整脈症例に関して、SCN5A の翻訳領域とともにプロモーター領域の変異の検索を行う。同定されたプロモーター領域の変異に関し、培養細胞を用いた機能解析を行う。また、これらの症例に対し、SCN5A プロモーターの機能調節領域である CNS28 のスクリーニングも行い、機能解析を行う。臨床的な特徴を心電図等の電気生理学的な所見を中心に検討する。不整脈症候群の症例と対照群を比較し、不整脈に関与する臨床的特徴と心電図所見を探索する。症例を蓄積し、これらの結果を検証するとともに臨床像をより詳細に解析し、様々な臨床的、心電図上の特徴の不整脈発症への関与について検討する。

(2) ChIP-Seq 解析を用いた転写調節領域の検索

心筋に発現するイオンチャネルやその機能修飾タンパクの遺伝子の変異は、不整脈発症の主

要な原因であると考えられる。これらの遺伝子のプロモーター領域や、その機能調節領域の配列の多くは同定されていない。しかし、これらの遺伝子の転写調節領域の変異は、チャンネルの発現量を変化させ、電流の増減を引き起こすことにより不整脈を発症する可能性がある。そこで、ChIP-Seq の手法を用いることにより、イオンチャンネルやその機能修飾タンパクの遺伝子の転写因子結合部位やヒストン修飾の部位を解析し、転写調節に関わる部位を同定する。

(3) 次世代シーケンスの手法を用いた不整脈症候群の遺伝子変異の同定

不整脈の原因遺伝子は Na⁺チャンネル、K⁺チャンネル、Ca²⁺チャンネル等のイオンチャンネルや、これらの機能を修飾するタンパク等多岐にわたる。これらの遺伝子や、ChIP-Seq 解析により同定された転写調節領域のシーケンスを従来法で行う場合、莫大な時間と労力を要する。近年開発された次世代シーケンス法は、短時間で全ゲノム解析のような膨大なデータを得ることが可能となる。この手法を用いて、イオンチャンネル、その関連タンパクの翻訳領域のみならず、プロモーター領域や ChIP-Seq 解析で得られた転写調節等の機能を持つ非翻訳領域の配列を同時にスクリーニングする。また、非翻訳領域に存在する、特定の遺伝子の発現を調節するマイクロ RNA が知られているが、正常な心機能の維持に関係するマイクロ RNA についても、同一のアッセイでスクリーニングを行う。申請者は、約 250 種の心筋細胞に発現する心臓電気生理活動への関与が示唆されてきたイオンチャンネルとその関連タンパクの遺伝子を同時にシーケンシングできるアッセイを構築し、既に複数の新規の遺伝子変異を同定していたが、さらに同時に検索可能な遺伝子数を約 450 種に増やし、これらのマイクロ RNA も加えた新たなアッセイを構築している。

(4) 同定した遺伝子変異の機能解析

同定した非翻訳領域の変異が不整脈症候群を発症させる機序を解明するため、変異によりもたらされる機能の変化の解析を行う。ルシフェラーゼレポーターアッセイの手法を用い、培養細胞に野生型あるいは変異型のプロモーターをトランスフェクションさせ、プロモーター活性の変化を調べる。また、既に我々はマウスの ChIP-Seq のデータを有しており、変異が存在するプロモーター領域や転写調節領域の塩基配列がヒトとマウスで保存されていた場合、遺伝子組み換えマウスを作成し、その不整脈基盤形成への役割を検討する。また、培養細胞や遺伝子組み換えマウスを用いて抗不整脈薬を中心とした様々な薬物の効果を検討して、個別化治療への臨床応用を目指す。

(5) 不整脈を来すリスク層別化と個別化治療の確立

本研究で新たに解明した臨床的特徴と遺伝子型ならびに機能解析の結果を個々の症例に還元する。遺伝子型と臨床像を組み合わせ、不整脈発作のリスクが高いと判断された症例に関しては、主に機能解析の結果より得られた不整脈基盤を形成する電気生理学的異常を是正するための薬物治療を行うことを目標とする。

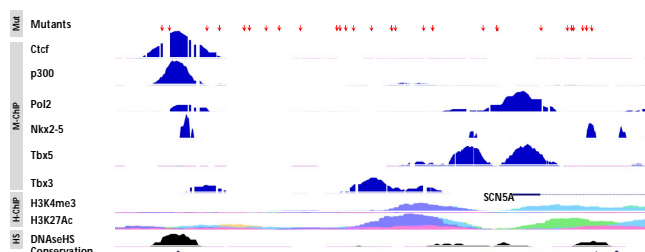
4. 研究成果

(1) SCN5A のタンパク翻訳領域およびその隣接領域に変異を認めない 1298 例の不整脈症例（心房細動 444 例、洞不全症候群 49 例、心臓伝導障害 133 例、Brugada 症候群 583 例、特発性心室細動 83 例、早期再分極症候群 6 例）および 816 例の不整脈を有しない対照群（日本人 534 例、白色人種 282 例）において、SCN5A のプロモーター領域の遺伝子検査を施行した。Brugada 症候群 114 例および心房細動 376 例が白色人種で、その他の 808 例は日本人症例であった。29 例の不整脈症例（心房細動 6 例、洞不全症候群 1 例、伝導障害 3 例、Brugada 症候群 14 例、特発性心室細動 5 例）において、26 種類の新規の SCN5A プロモーター領域の rare variant を同定した。Rare variant が同定された症例は、男性 23 例（79%）、平均年齢 44 ± 20 歳であった。心房細動の 1 例は 2 種類の SCN5A プロモーターの rare variant を有していた。複数の症例において、同一の rare variant が同定された。また、SCN5A のプロモーター領域の rare variant を有する症例の 18 例（62%）で伝導障害を、3 例（12%）で早期再分極を認めた。QT 時間の異常を有する症例はなかった。不整脈、心臓突然死の家族歴を有する症例は 11 例（37%）であった。Brugada 症候群に限ると、日本人では 469 例中 14 例（3%）で SCN5A のプロモーター領域の rare variant を認めたが、白色人種では 114 例中 1 例も認められなかった（0%）。

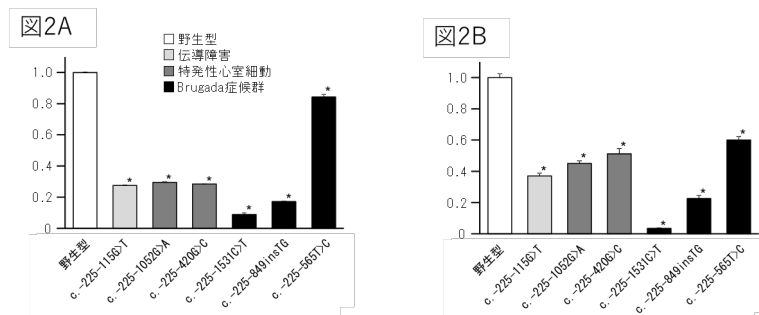
(2) 同定された rare variant をマウスのゲノム上にマッピングし、ChIP-Seq で得られた転写因子の結合と比較した（図 1）。同定された多くの rare variant は転写因子結合部位に存在しており、これらの rare variant が転写因子との結合能に異常を来し、SCN5A の発現量を変化させる可能性が示唆された。

(3) ルシフェラーゼレポーターアッセイの手法を用いて、同定された 6 種類の SCN5A プロモーター領域の rare variant の機能解析を行った。HEK293 細胞（図 2A）、HL-1（図 2B）のいずれの培養細胞においても、各 rare variant は野生型に比べプロモーター活性が有意に低下していた。

図 1



(4)177 例の遺伝性不整脈および不整脈を合併した心筋症の症例において、次世代シーケンスを用いて、心筋に発現するイオンチャネルおよびその修飾タンパク、心筋の発生や維持に重要な役割を果たす転写因子や調節因子、マイクロRNA等を網羅的に検索した。得られた結果は、タンパク翻訳領域にアミノ酸置換を伴う変異やアミノ酸の欠失/挿入を伴う変異を有する症例を除外し、Na⁺チャネル、K⁺チャネル、Ca²⁺チャネルのプロモーター領域の変異を同定する。現在、遺伝子検査の結果の解析を行っている。今後、同定されたプロモーターの機能解析を行う予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

Nobue Yagihara, Hiroshi Watanabe, Tohru Minamino, 他計 33 名, Variants in the SCN5A Promoter Associated With Various Arrhythmia Phenotypes. Journal of American Heart Association, American Heart Association, 査読有, 2016, Sep 13;5(9). DOI; 10.1161/JAHA.116.003644

〔学会発表〕(計 1 件)

八木原 伸江、Identification of mutations in causative genes for cardiomyopathies in patients with arrhythmia syndromes and structurally normal heart. 第 82 回日本循環器学会学術集会

〔図書〕(計 0 件)

〔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

(2)研究協力者

研究協力者氏名：渡部 裕

ローマ字氏名：Hiroshi Watanabe

研究協力者氏名：南野 徹

ローマ字氏名：Tohru Minamino

研究協力者氏名：佐藤 光希

ローマ字氏名：Akinori Sato

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。