様　式　C－19、F－19－1、Z－19　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ９ 月　 ７ 日現在

機関番号：１４４０１
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2018～2019
課題番号：１８Ｋ１９５４７

研究課題名（和文）ACh感受性Kチャネルに対する新規心拍調節治療薬の開発のための変異解析基盤の構築

研究課題名（英文）Elucidation of the pathological mechanism of KACh channelopathy and development of novel heart rate modulating drug

研究代表者

朝野　仁裕（Asano, Yoshihiro）

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：６０５２７６７０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,800,000円

研究成果の概要（和文）：遺伝性徐脈家系を臨床にて単離しKir3.1蛋白をコードするKCNJ3遺伝子の新規希少変異を世界に先駆け同定した。Kir3.1蛋白が構成する心臓アセチルコリン作動性内向き整流性カリウムチャネルの遺伝子異常により、徐脈、房室ブロック、徐脈性心房細動を発症することを見出した。KACh チャネロパチー患者で同定されたバリアントの機能解析の結果、KACh チャネル電流の異常活性化が引き起こされることが示唆された。遺伝性希少難病の自然歴および表現型の情報を蓄積すること、そして細胞のみならず生体における機能変化と薬効評価の情報を突合させることで、遺伝要因と表現型の因果関係が明らかとなった。

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に対して安全かつ慢性期使用に耐え得る心拍増加薬はなく、侵襲を余儀なくされるペースメーカー等の対症治療に頼らざるを得ない。本研究において徐脈、房室ブロック、心房細動の原因となることを見出し、それらの原因となる遺伝要因を網羅的に探索しそれぞれの機能性変化を明確にすることで、新たな希少難病であるKAChチャネロパチーおよびその関連疾患の疾患概念の確立から臨床診断が可能となる。さらに疾患克服を目指すための治療標的探索を通じて、実臨床に還元できる治療法開発が可能となる。

研究成果の概要（英文）：We established KACh channelopathy, an inherited bradyarrhythmia consisting of sick sinus syndrome, atrioventricular block, and atrial fibrillation. Whole exome sequencing analysis was performed using a genomic cohort and pathogenic variants were identified among the genes associated with KACh channelopathy. We analysed the molecular mechanism of KACh channel-mediated regulation, assessed its function, and evaluated for drug efficacy by functional analysis and in vivo evaluation.

研究分野：循環器内科学

キーワード：希少難病　分子循環器学　徐脈性不整脈　洞不全症候群　ゲノム解析　創薬開発

※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。

１．研究開始当初の背景

(1)　心臓の拍動は精緻なリズム調節機構により制御されている。洞結節、房室結節を含む刺激伝導系の機能的破綻は、生理的な脈拍調節を無効にし、身体活動度および生活の質の低下をもたらす。慢性疾患のみならず、ヒトの生命機能維持にかかわる低心拍出量性心不全に直結し、急性変化による突然の意識消失、急性突然死の原因にもなり得る。

(2)　遺伝性徐脈家系を臨床にて単離し、遺伝子解析により Kir3.1 蛋白をコードする KCNJ3 遺伝子の新規希少変異を世界に先駆け同定した。Kir3.1 蛋白が構成する心臓アセチルコリン作動性内向き整流性カリウムチャネル（KACh チャネル）の遺伝子異常により、徐脈、房室ブロック、徐脈性心房細動を発症することを見出した。

(3)　同疾患に対して安全かつ慢性期の継続使用に耐え得る有効な、心拍増加を目的とした分子標的治療薬はなく、原因不明のままペースメーカー等高額デバイスを機能補完として用いた、侵襲的かつ対症療法的な治療に頼らざるを得ないのが現状である。

(4)　対症療法としてペースメーカー治療の有効性は認めるがデバイス感染やリード断線による致死的合併症、電磁干渉や自律神経調節不良による日常生活の質低下など多くの限界がある。小児期に発症する不整脈に対してペースメーカーの植え込みを実施した場合、成長に伴うリード長不足によるデバイス変更を余儀なくされるため、若年発症の難治性疾患でもある遺伝性徐脈性不整脈を克服するには未だ大きな課題が残っている。

２．研究の目的

(1)　遺伝性徐脈性不整脈の疾患原因遺伝子である、アセチルコリン感受性カリウムチャネル関連遺伝子群の疾患バリアントがもたらす機能変化および分子機能阻害薬の効果を確認する。臨床・ゲノム情報から候補バリアント情報を蓄積しKACh チャネルを標的とした抗不整脈薬剤の開発に必要な基礎研究を行う。

(2)　洞不全症候群、房室ブロック、徐脈性心房細動などに代表される進行性の遺伝性徐脈性不整脈疾患の疾患概念を確立し、機序解明、治療薬を開発するための基礎研究基盤を構築する。網羅的ゲノムバリアント情報解析を実施することによりレアバリアントを検出し、アフリカツメガエル卵母細胞に導入し、変異体の電流増加と、阻害剤の用量依存的なカリウム電流抑制効果を検討する。疾患機序解明のため徐脈を呈する KCNJ3 遺伝子改変ゼブラフィッシュへの迅速生体薬効評価を行うことで、新しい分子機序に立脚した治療薬開発の基礎データを取得し分子標的治療薬の開発研究基盤の構築を行う。

３．研究の方法

(1)　網羅的ゲノムバリアント情報解析を実施による希少変異の検出：

遺伝性徐脈性疾患の疫学情報取得、多数検体を解析可能な標的遺伝子解析パネルの開発による KCNJ3/KCNJ5 遺伝子および関連遺伝子群のバリアントスクリーニング、得られた KACh チャネルのバリアント情報を導入した生化学・生理学的解析を実施する。

(2)　検出バリアントの導入による用量依存的カリウム電流抑制効果確認実験：

KACh チャネルの特性と同阻害剤の効果を確認するため、Xenopus Oocyte を用いて同定バリアントの電気生理学的機能解析を行う。薬理作用および特異的機序を解析する。

(3)　徐脈を呈する KCNJ3 遺伝子改変ゼブラフィッシュへの迅速生体薬効評価:

動物生体内の KACh チャネル活性評価系を作製し、ヒト疾患の原因となった変異型 KACh チャネルに対する本薬剤の効果を Whole Body Assay にて検証する。

４．研究成果

(1)　網羅的ゲノムバリアント情報解析を実施による希少変異の検出：

遺伝性徐脈家系について遺伝子解析を行い心拍数調整に関連する KACh チャネルをコードする KCNJ3 遺伝子に新規変異（c.247A>C,p.N83H）を同定した（図１）。心拍数調節に関連するアセチルコリン感受性カリウムチャネル(KACh チャネル)は、KCNJ3 がコードする Kir3.1 と、KCNJ5 がコードする Kir3.4 のヘテロ四量体として、心臓において洞房結節、房室結節、刺激伝導系および心房筋に発現しており関連遺伝子によるものも含めて、遺伝性徐脈性不整脈（KACh チャネロパチー）として新たに定義した。KACh チャネロパチーは、心臓の器質的疾患や加齢性変性による一般の徐脈性不整脈とは異なり、若年時より洞性徐脈を呈し、その後、若年で発作性心房細動や一過性房室ブロックの合併に至る超希少疾患であった。

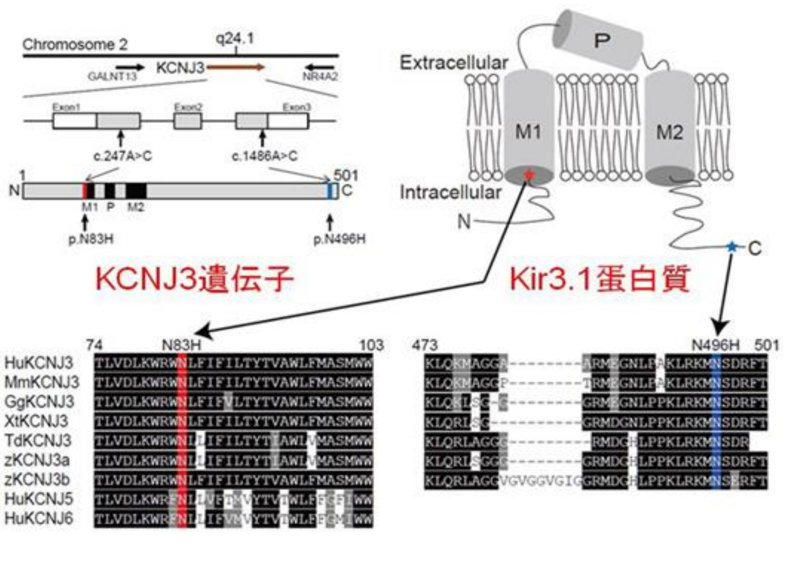

図１． KCNJ3 遺伝子（Kir3.1）の変異バリアント

(2)　遺伝性徐脈性疾患の患者実数の評価のための網羅的にバリアント解析：

標的遺伝子解析パネルによる大規模解析が可能なために独自の情報解析法として新たに構築したパイプラインを用いて、関連遺伝子バリアントのスクリーニング解析を行った（図２）。既存疾患ゲノムレジストリ研究から得た症例のゲノム解析をした結果、N83H の新規バリアント以外に、KCNJ3/KCNJ5 遺伝子に複数のレアバリアントを同定した。の一部は既に同種不整脈に罹患している症例の弛緩ゲノムであり、その後、海外から報告された遺伝性徐脈家系（原因遺伝子：KCNJ5）の情報からも、KACh チャネロパチー患者が潜在的にいることが明らかになった。

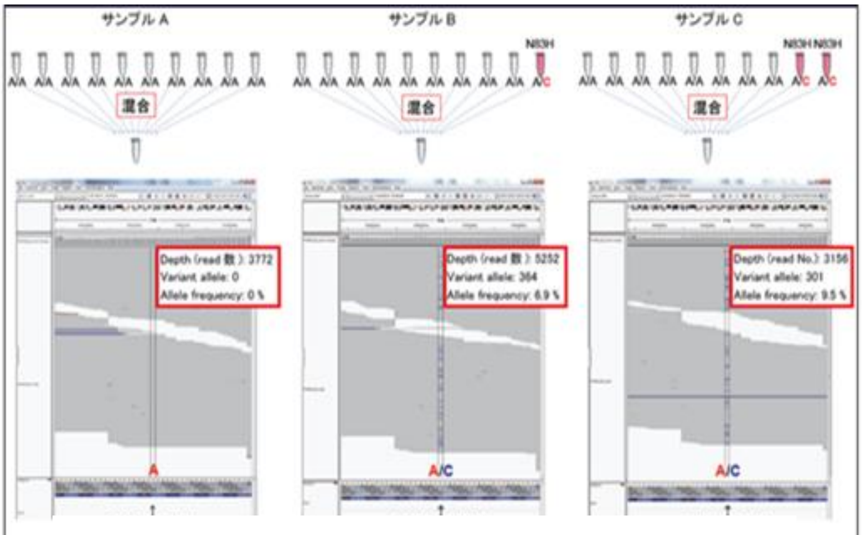

図２．網羅的解析可能な標的遺伝子解析パネルの開発

(3)　検出バリアントの導入による用量依存的カリウム電流抑制効果確認実験：

疾患バリアントに対する KACh チャネルの生化学的・生理学的特性解析を実施した。KACh チャネルの特性と薬剤の阻害剤の効果を確認するため Xenopus Oocyte を用いて電気生理学的機能解析を実施した結果、本チャネルは、副交感神経が活性化すると、迷走神経終端よりアセチルコリンが放出され、ムスカリン作動性アセチルコリン受容体の活性化を介して KACh チャネルが開口し、カリウムイオンが細胞外へ流出することにより心拍数を減少させる生理作用を有することが明らかとなった（図３）。

(4)　徐脈を呈する KCNJ3 遺伝子改変ゼブラフィッシュへの迅速生体薬効評価:

確立した生体内の KACh チャネル活性評価系を用いて、ヒト疾患の原因となった変異型 KACh チャネルに対する本薬剤の効果を Zebrafish の Whole Body Assay にて検証した。同定した主なレアバリアントの中に野生型チャネルと比べ電流量が有意に大きく、疾患発症に関与している可能性が示唆されるものがあった。他のグループから KCNJ5 遺伝子（c.303G>C, p.W101C）、および GNB2 遺伝子（c.155G>T, p.R52L）が、KCNJ3 p.N83H 変異と同様に KACh チャネル電流の異常活性化をきたす若年発症の徐脈性不整脈疾患原因遺伝子変異として報告された。

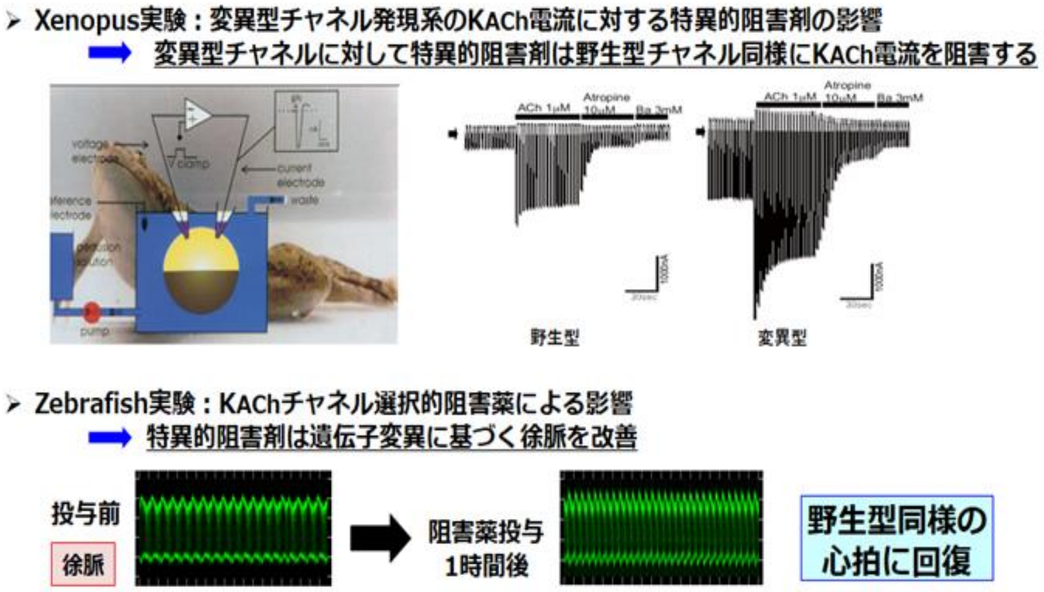

図３．電気生理学的検査による変異型KAChチャネルの機能変化

＜まとめ＞

以上から、本研究では遺伝性徐脈の原因として KCNJ3 遺伝子のヒト症例新規希少変異を世界で初めて報告した。KACh チャネロパチー患者で同定されたレアバリアントの機能解析の結果、KACh チャネルの開口確率増加による、チャネル電流の異常活性化が引き起こされることが示唆された。徐脈、房室ブロック、心房細動の原因となることを見出し疾患概念の確立および同疾患への治療法開発を行うことで、新たな疾患治療薬として治験開発可能となるため発展させる必要があると考えられた。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計12件（うち査読付論文　12件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　3件）

１．著者名 Yamada Noriaki、Asano Yoshihiro、Fujita Masashi、Yamazaki Satoru、 et al.	４．巻 139
２．論文標題 Mutant KCNJ3 and KCNJ5 Potassium Channels as Novel Molecular Targets in Bradyarrhythmias and Atrial Fibrillation	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Circulation	６．最初と最後の頁 2157～2169
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036761	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 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.	４．巻 6
２．論文標題 Impact of cardiac myosin light chain kinase gene mutation on development of dilated cardiomyopathy.	５．発行年 2019年
３．雑誌名 ESC Heart Fail.	６．最初と最後の頁 406～415
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ehf2.12410.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Asanuma H, Chung H, Ito S, Min KD, Ihara M, Takahama H, Funayama M, Imazu M, Fukuda H, Ogai A, Asano Y, Minamino T, Takashima S, Morita T, Sugimachi M, Asakura M, Kitakaze M.	４．巻 33
２．論文標題 AST-120, an Adsorbent of Uremic Toxins, Improves the Pathophysiology of Heart Failure in Conscious Dogs.	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Cardiovasc Drugs Ther.	６．最初と最後の頁 277～286
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1007/s10557-019-06875-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Masumoto R, Kitagaki J, Fujihara C, Matsumoto M, Miyauchi S, Asano Y, Imai A, Kobayashi K, Nakaya A, Yamashita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S.	４．巻 54
２．論文標題 Identification of genetic risk factors of aggressive periodontitis using genomewide association studies in association with those of chronic periodontitis.	５．発行年 2019年
３．雑誌名 J Periodontal Res	６．最初と最後の頁 199-206
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jre.12620.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

1．著者名 Tsuchida S, Matsuzaki T, Yamato M, Okuda K, Fu HY, Araki R, Sanada S, Asanuma H, Asano Y, Asakura M, Hao H, Takashima S, Kitakaze M, Sakata Y, Mekada E, Minamino T.	4．巻 59
2．論文標題 Anti-HB-EGF Antibody-Mediated Delivery of siRNA to Atherosclerotic Lesions in Mice	5．発行年 2018年
3．雑誌名 Int Heart J.	6．最初と最後の頁 1425-1431
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1536/ihj.17-644.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

1．著者名 Ishihara S, Kioka H, Ohtani T, Asano Y, Yamaguchi O, Hikoso S, Toda K, Saito Y, Sawa Y, Yamauchi-Takihara K, Sakata Y.	4．巻 8
2．論文標題 Successful treatment of severe combined post- and pre-capillary pulmonary hypertension in a patient with idiopathic restrictive cardiomyopathy.	5．発行年 2018年
3．雑誌名 Pulm Circ.	6．最初と最後の頁 29575985
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/2045894018770131.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 Asano Y.	4．巻 S2352
2．論文標題 How to Eliminate Uncertainty in Clinical Medicine - Clues from Creation of Mathematical Models Followed by Scientific Data Mining.	5．発行年 2018年
3．雑誌名 EBioMedicine.	6．最初と最後の頁 30240-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ebiom.2018.07.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 Ogawa Kotaro、Okuno Tatsusada、Hosomichi Kazuyoshi、Hosokawa Akiko、Hirata Jun、Suzuki Ken、Sakaue Saori、Kinoshita Makoto、Asano Yoshihiro、Miyamoto Katsuichi、Inoue Ituro、Kusunoki Susumu、Okada Yukinori、Mochizuki Hideki	4．巻 16
2．論文標題 Next-generation sequencing identifies contribution of both class I and II HLA genes on susceptibility of multiple sclerosis in Japanese	5．発行年 2019年
3．雑誌名 Journal of Neuroinflammation	6．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12974-019-1551-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 Kamikubo Kenta、Kato Hisakazu、Kioka Hidetaka、Yamazaki Satoru、Tsukamoto Osamu、Nishida Yuya、Asano Yoshihiro、Imamura Hiromi、Kawahara Hiroyuki、Shintani Yasunori、Takashima Seiji	4．巻 294
2．論文標題 A molecular triage process mediated by RING finger protein 126 and BCL2-associated athanogene 6 regulates degradation of G0/G1 switch gene 2	5．発行年 2019年
3．雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6．最初と最後の頁 14562～14573
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.008544	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

1．著者名 Nagao Takemasa、Shintani Yasunori、Hayashi Takaharu、Kioka Hidetaka、Kato Hisakazu、Nishida Yuya、Yamazaki Satoru、Tsukamoto Osamu、Yashirogi Shohei、Yazawa Issei、Asano Yoshihiro、Shinzawa‐Itoh Kyoko、Imamura Hiromi、Suzuki Takeo、Suzuki Tsutomu、Goto Yu‐ichi、Takashima Seiji	4．巻 34
2．論文標題 Higd1a improves respiratory function in the models of mitochondrial disorder	5．発行年 2020年
3．雑誌名 The FASEB Journal	6．最初と最後の頁 1859～1871
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201800389R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

1．著者名 Kioka Hidetaka、Kato Hisakazu、Fujita Takeshi、Asano Yoshihiro、Shintani Yasunori、Yamazaki Satoru、Tsukamoto Osamu、Imamura Hiromi、Kogo Mikihiko、Kitakaze Masafumi、Sakata Yasushi、Takashima Seiji	4．巻 34
2．論文標題 In vivo real‐time ATP imaging in zebrafish hearts reveals G0s2 induces ischemic tolerance	5．発行年 2020年
3．雑誌名 The FASEB Journal	6．最初と最後の頁 2041～2054
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201901686R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

1．著者名 Shimizu Akio、Zankov Dimitar P.、Sato Akira、Komeno Masahiro、Toyoda Futoshi、Yamazaki Satoru、Makita Toshinori、Noda Taichi、Ikawa Masahito、Asano Yoshihiro、Miyashita Yohei、Takashima Seiji、Morita Hiroshi、Ishikawa Taisuke、Makita Naomasa、Hitosugi Masahito、Matsuura Hiroshi、Ohno Seiko、Horie Minoru、Ogita Hisakazu	4．巻 34
2．論文標題 Identification of transmembrane protein 168 mutation in familial Brugada syndrome	5．発行年 2020年
3．雑誌名 The FASEB Journal	6．最初と最後の頁 6399～6417
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi:10.1096/fj.201902991R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

〔学会発表〕　計12件（うち招待講演　12件／うち国際学会　2件）

1．発表者名 朝野仁裕
2．発表標題 Japan Heart Foundation the 44th Sato Memorial Award "Elucidation of the Molecular Mechanism, Establishment of Diagnostic Method, and Drug Development by Omics Analysis of Intractable Cardiovascular Diseases"
3．学会等名 The 83rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society（招待講演）
4．発表年 2019年

1．発表者名 朝野仁裕
2．発表標題 Symposium 17. Precision Medicine in Inherited Arrhythmias "New Insights into the Therapeutic Potential of a KACh Channel in Hereditary Sinus Bradycardia"
3．学会等名 The 83rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society（招待講演）
4．発表年 2019年

1．発表者名 朝野仁裕
2．発表標題 ミート・ザ・エキスパート 11 心筋症の新しい話題 "Application of Whole Exome Sequencing Data for Detection of Large Genomic Rearrangements in Cardiomyopathy"
3．学会等名 The 83rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society（招待講演）
4．発表年 2019年

1．発表者名 朝野仁裕
2．発表標題 特別企画8「我が国における循環器病研究の現状と将来展望」
3．学会等名 第22回日本心不全学会（招待講演）
4．発表年 2018年

1．発表者名 朝野仁裕
2．発表標題 第6回日本心不全学会学術賞受賞講演：多層オミックス解析による心不全分子基盤の解明とゲノム医療を目指す診断治療法の開発
3．学会等名 第22回日本心不全学会（招待講演）
4．発表年 2018年

1．発表者名 朝野仁裕
2．発表標題 シンポジウム2「循環器領域における遺伝子診断と遺伝カウンセリング」希少循環器疾患におけるゲノム解析による遺伝子診断
3．学会等名 第22回日本心不全学会（招待講演）
4．発表年 2018年

1．発表者名 朝野仁裕
2．発表標題 シンポジウム5. Practice and Application of Whole Exome Sequencing in Hereditary Heart Disease
3．学会等名 The 2nd JCS Council Forum on Basic Cardiovascular Research（招待講演）
4．発表年 2018年

1．発表者名 朝野仁裕
2．発表標題 シンポジウム3. ゲノム情報を心筋症診療に生かす「拡張型心筋症における全エクソームシーケンスの応用と展望」
3．学会等名 第4回心筋症研究会（招待講演）
4．発表年 2018年

1．発表者名 Yoshihiro Asano
2．発表標題 Genomic medicine in sinus bradycardia and a strategy for development of a novel targeted therapy
3．学会等名 2019 XXIII ISHR WORLD CONGRESS（国際心臓研究会世界大会）Symposium（招待講演）（国際学会）
4．発表年 2019年

1．発表者名 Yoshihiro Asano
2．発表標題 Cardiomyopathies: genetic causes and precision medicine
3．学会等名 ESC CONGRESS 2019（欧州心臓病学会年会）Symposium（招待講演）（国際学会）
4．発表年 2019年

1．発表者名 朝野仁裕
2．発表標題 心筋症の遺伝子診断における問題点と解決策
3．学会等名 第23回日本心不全学会学術集会シンポジウム14「心筋症と遺伝子診断」（招待講演）
4．発表年 2019年

1．発表者名 Yoshihiro Asano
2．発表標題 Genome Analysis and Genomic Medicine in Cardiomyopathy
3．学会等名 第84回日本循環器学会学術集会（開催延期）（招待講演）
4．発表年 2020年

〔図書〕　計5件

1．著者名 朝野仁裕	4．発行年 2019年
2．出版社 医歯薬出版株式会社	5．総ページ数 -
3．書名 医学のあゆみ　遺伝性心血管疾患のすべて　遺伝性徐脈性不整脈におけるゲノム医療へのアプローチ	

1．著者名 朝野仁裕	4．発行年 2019年
2．出版社 日本心臓財団・日本循環器学会（日本医学出版）	5．総ページ数 -
3．書名 月刊心臓　HEART's Selection　心臓病に挑むゲノム医療	

1．著者名 朝野仁裕	4．発行年 2019年
2．出版社 日本心臓財団・日本循環器学会（日本医学出版）	5．総ページ数 -
3．書名 月刊心臓　心不全層別化に向けた疾患ゲノム解析	

1．著者名 朝野仁裕	4．発行年 2020年
2．出版社 文光堂	5．総ページ数 -
3．書名 新心臓病学　第7章心筋疾患・心膜疾患　不整脈原性右室心筋症	

1．著者名 朝野仁裕	4．発行年 2020年
2．出版社 メディカルレビュー社	5．総ページ数 -
3．書名 CARDIAC PRACTICE　循環器疾患のPrecision Medicine　不整脈Precision Medicineへ向けた試み	

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考