

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08319

研究課題名(和文) 家族性WPW症候群における全エクソーム解析による原因遺伝子の探索

研究課題名(英文) Exploratory research of causal genes by whole-exome sequencing in patients with familial WPW syndrome

研究代表者

深澤 佳絵 (FUKASAWA, YOSHIE)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：00612764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：家族性WPW症候群の8家系で原因遺伝子探索を行った。原因遺伝子として知られるPRKAG2の病的バリエーションが確認されたのは1家系のみだった。3世代以上に渡りWPW症候群を呈している1家系で肥大型心筋症の原因遺伝子(遺伝子X)のミスセンス変異が確認された。本遺伝子異常によるWPW症候群の報告は過去になく、新規表現型と考えられた。他6家系では原因遺伝子は特定できなかった。遺伝子Xの病的バリエーションによりWPW症候群を呈することを証明すべく、機能解析実験を検討した。CRISPR-Cas9によるモデルマウスを作成し、埋め込み型心電計による解析を検討しているが、設備的・金銭的問題により実現できていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「家族性WPW症候群の原因遺伝子=PRKAG2」として知られているが、意外にもPRKAG2遺伝子の病的バリエーションを有する確率は低いことが示された。また、PRKAG2遺伝子変異でもWPW症候群と肥大型心筋症と合併することが多いと報告されているが、この度確認された遺伝子Xについても肥大型心筋症の原因遺伝子であり、両疾患の発症には共通する分子メカニズムが存在する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We conducted search for causal genes in 8 families with familial WPW syndrome by whole-exome sequencing. Only one family identified a pathogenic variant of PRKAG2 gene, already known as the causal gene of familial WPW syndrome. A missense mutation in a causal gene (gene X) of hypertrophic cardiomyopathy was confirmed in one family with WPW syndrome for more than 3 generations. There was no report of WPW syndrome caused by this gene variant, it was considered to be a novel phenotype. The causal gene couldn't detect in the other 6 families.

We planned an experimental functional analysis to prove that the pathogenic variant of gene X presents with WPW syndrome. We planned to create a model mouse using CRISPR-Cas9 and detect supraventricular tachycardia caused by WPW syndrome with an implantable electrocardiograph, but we couldn't realize due to equipment and financial problems.

研究分野：小児循環器分野

キーワード：WPW症候群 PRKAG2遺伝子 エクソーム解析

1. 研究開始当初の背景

- (1) WPW 症候群は、正常な刺激伝導系のほかに、先天的に心房と心室を伝導する副伝導路を持つことにより上室頻拍をきたす疾患で、時に突然死を起こす。頻拍発作を契機に診断される例がいる一方で、安静時 12 誘導心電図でデルタ波と呼ばれる特徴的な波形を呈するため、学校心電図検診で偶然に診断される症例も多い。
- (2) WPW 症候群の発症機序についてはよくわかっていない。WPW 症候群の多くは孤発例であるが、一部に常染色体優性遺伝の家族例も認められる。家族性 WPW 症候群の原因遺伝子はこれまでサンガー法を中心に原因遺伝子が解析され、そのほとんどが炭水化物と資質の代謝に関わる AMPK のサブユニットをコードする *PRKAG2* 遺伝子の変異であると報告されている。また、WPW 症候群では肥大型心筋症を合併する例が一部あるが、*PRKAG2* 遺伝子を原因とする家族性 WPW 症候群では肥大型心筋症の合併が比較的多い。一方で *PRKAG2* 遺伝子に病的バリエーションを有さない家系も報告されている。家族性 WPW 症候群においては、*PRKAG2* 遺伝子以外の原因遺伝子として *MYH6* 遺伝子の変異を持つ 1 家系の報告があるのみであり、未知の原因遺伝子が存在する可能性が示唆されている。
- (3) 家族性 WPW 症候群の遺伝子変異の報告はこれまでに 15 報あるが、その多くがサンガー法による解析で、全エクソーム解析の報告は 1 報のみである。また、家系の数では 6 家系の解析が最大であり、ほとんどが単一家系での解析である。次世代シーケンサーによる全エクソーム解析で原因遺伝子を特定することは全例で可能なわけではなく、候補遺伝子が絞り込めないなどの理由で同定できないこともある。遺伝子の特定のためには家系の数が多いほど有利であり、今回今までの報告で最大である 8 家系の解析を行うことによって、未知の原因遺伝子が特定される可能性があると考えた。

2. 研究の目的

- (1) これまでの報告では最大の 8 家系の常染色体優性遺伝形式を持つ家族性 WPW 症候群の家系に対して、サンガー法により *PRKAG2* 遺伝子の病的バリエーションの有無を確認する。*PRKAG2* 遺伝子の病的バリエーションが特定できなかった家系全てに対し、この疾患ではこれまで 1 報しか報告がない、次世代シーケンサーによる全エクソーム解析を行い、未知の原因遺伝子を探索することを目的とする。
- (2) 原因遺伝子が特定された場合には、同定されたバリエーションが WPW 症候群の発症に影響を及ぼしているかを確認するために、機能解析実験を試みることに。
- (3) 原因遺伝子が特定された家系に対して、同一の遺伝型の家系内で、どのような表現型を持つかを調査するために、心電図波形の特徴、心筋症の有無、その他の臨床経過も含め患者ごとに評価する。これらを明らかにすることで、家族性 WPW 症候群の発症機序や病態が明らかになり適切な管理につなげること。

3. 研究の方法

- (1) 名古屋大学医学部附属病院および近隣の研究協力施設で確認された家族性 WPW 症候群のうち、本研究に対して同意を得られた 8 家系を研究対象とする。家族性 WPW 症候群の家系の各メンバー（未成年者の場合は代諾者）からは書面による同意を取得し、家系メンバーより血液あるいは唾液サンプルを採取し、匿名化された検体を集積する。また、診療録から得られた臨床症状、心エコー所見、心電図所見などの診療情報についても併せて情報を得る。
- (2) 血液、唾液サンプルより QIAamp DNA Blood Mini Kit を用い DNA を抽出し、その DNA を用いて家系内の罹患者に対し *PRKAG2* 遺伝子のサンガーシーケンスを行い、既報の病的バリエーションの有無を確認する。病的バリエーションを認めた場合は、家系内のその他の罹患者および非罹患者において、同様にサンガー法にて *PRKAG2* 遺伝子の病的バリエーションを確認したうえで、病的バリエーションの有無が罹患しているか否かと一致するかを確認する。
- (3) *PRKAG2* 遺伝子の病的バリエーションが確認されなかった家系においては、SureSelect

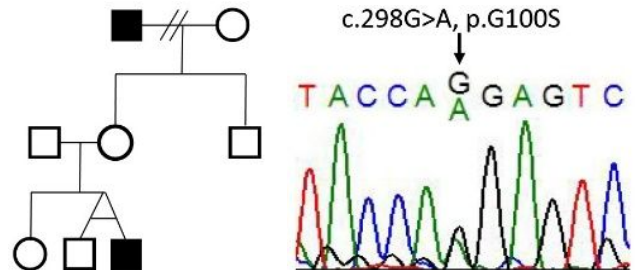
Human All Exon kit を用いて全エクソームライブラリを作成する。次世代シーケンサー HiSeq2500 を用いて全エクソームシーケンスを行い、得られた候補遺伝子リストから、各種データベース(1000 Genomes、 Exome Sequencing Project、 8.3KJPN 等の公開データベースに加えて In-house のデータベース)から得られた minor allele frequency により、高頻度 SNV を除外する。また、SIFT、PolyPhen2 などのプログラムを用い in silico のたんぱく機能解析を行うことで障害性の強い変異を予測し、遺伝形式等も加味し候補遺伝子の絞り込みを行う。候補遺伝子の絞り込みには、心臓での発現が報告されている、あるいは心臓発生に関わることが報告されているなどの発現・機能の情報も併せて参考にする。単一家系内での絞り込みが困難であった場合は、解析する家系の数を増やし、複数の家系に共通する候補遺伝子を検索する。

- (4) 全エクソーム解析によって原因遺伝子が絞り込めれば、全エクソーム解析を行っていない同一家系の残りの構成員についても、候補遺伝子のバリエーションの有無をサンガー法で確認する。バリエーションが家系全体で疾患を持つ人と持たない人で、バリエーションの有無と一致するかを確認する。また、このバリエーションが Human Genome Mutation Database や Clinvar などのデータベースで既報のものかを確認する。
- (5) 候補遺伝子の機能解析実験を行い、同定された変異が機能に影響を及ぼすものであることを確認する。患者の末梢血単核球から RNA を抽出し、逆転写して、PCR で野生型と変異型の候補遺伝子を増幅する。増幅された遺伝子を pcDNA3.1 ベクターにクローニングし、EndoFree Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) を使って精製する。野生型および変異型を HEK293 細胞にトランスフェクションして、パッチクランプ法による機能解析を行う。評価が困難だった場合は、CRISPR-Cas9 により候補遺伝子のノックインマウスを作成し、心電計を用いて上室頻拍発作の有無を解析する。
- (6) 原因遺伝子が特定された家系については、心電図波形、心エコー所見、臨床経過を含めた表現型を患者ごとに評価する。

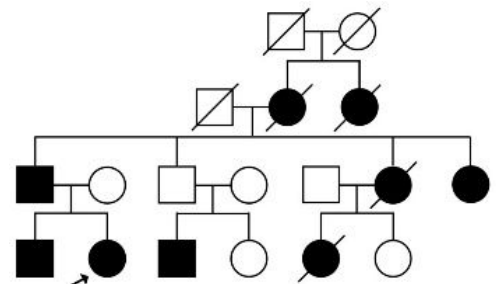
4. 研究成果

全 8 家系に対して遺伝子解析を行った。いずれの家系も 2~3 世代に渡り WPW 症候群が確認されており、発症者数は 2~9 人であった。

- (1) *PRKAG2* 遺伝子のサンガーシーケンス
全 8 家系中、既報の *PRKAG2* 遺伝子の病的バリエーションが確認されたのは 1 家系のみであった。右図に示す家系で、c.298G>A (p.G100S) が確認され (既知変異)、遺伝形式と合致したため原因遺伝子であると判断した。



- (2) 全エクソーム解析
PRKAG2 遺伝子変異を検出できなかった 7 家系に対し全エクソーム解析を行った。3 世代以上にわたり、発症者が 9 人の大家系 (右図) では、候補遺伝子の絞り込みにより、遺伝子 X が最終候補となった。遺伝子 X は肥大型心筋症の原因遺伝子として知られているが、WPW 症候群の発症は過去に報告がなく、新規の原因遺伝子の可能性が示唆された。



他の 6 家系では、候補遺伝子の絞り込みは 50~100 までしか絞り込むことができなかった。いずれの家系も、心疾患 (心筋症、不整脈) の明らかな原因となる遺伝子バリエーションは認めなかった。2 家系に共通する遺伝子が数個あったが、3 家系以上に共通する遺伝子は認めなかった。引き続き、新規の家族性 WPW 症候群家系を集積し、原因遺伝子の絞り込みを継続する方針である。

- (3) 機能解析実験

上述の遺伝子 X のバリエーションが WPW 症候群を呈することを証明するべく、機能解析

実験を計画した。野生型および変異型の遺伝子 X を HEK293 細胞にトランスフェクションして、パッチクランプ法による機能解析を試みたが、HEK293 細胞は心筋由来細胞ではないため機能解析の評価が困難であり、頓挫した。続いて、CRISPR-Cas9 によるノックインマウスを作成し、心電計を用い評価することを計画した。WPW 症候群の評価法として、埋め込み型心電計による上室頻拍の有無の確認による評価を計画したが、設備的・金銭的な点から実現できなかった。このモデルマウスに対する評価方法については、全身麻酔下で心電計装着し評価する方法を検討しており、現在準備している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamamoto Hidenori, Hayano Satoshi, Okuno Yusuke, Onoda Atsuto, Kato Kohji, Nagai Noriko, Fukasawa Yoshie, Saitoh Shinji, Takahashi Yoshiyuki, Kato Taichi	4. 巻 326
2. 論文標題 Phosphorylated proteome analysis of a novel germline ABL1 mutation causing an autosomal dominant syndrome with ventricular septal defect	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 81 ~ 87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijcard.2020.10.032	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 Kataoka Shinsuke, Kawashima Nozomu, Okuno Yusuke, Muramatsu Hideki, Miwata Shunsuke, Narita Kotaro, Hamada Motoharu, Murakami Norihiro, Taniguchi Rieko, Ichikawa Daisuke, Kitazawa Hironobu, Suzuki Kyogo, Nishikawa Eri, Narita Atsushi, Nishio Nobuhiro, Yamamoto Hidenori, Fukasawa Yoshie, Kato Taichi, Takahashi Yoshiyuki	4. 巻 148
2. 論文標題 Successful treatment of a novel type I interferonopathy due to a de novo PSMB9 gene mutation with a Janus kinase inhibitor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 639 ~ 644
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2021.03.010	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 Yamamoto Hidenori, Fukasawa Yoshie, Ohashi Naoki, Yokoyama Takehiko, Suzuki Kazutaka, Ota Takaya, Yasuda Kazushi, Omoya Kentaro, Takahashi Yoshiyuki, Kato Taichi	4. 巻 61
2. 論文標題 Prediction of postnatal clinical course in primary congenital dilated cardiomyopathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 1196 ~ 1201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.14029	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 Morimoto Yoshihito, Go Kiyotaka, Yamamoto Hidenori, Fukasawa Yoshie, Nakai Michikazu, Morihana Eiji, Yasuda Kazushi, Nishikawa Hiroshi, Ohashi Naoki, Takahashi Yoshiyuki, Kato Taichi	4. 巻 44
2. 論文標題 Conception by assisted reproductive technology in infants with critical congenital heart disease in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Reproductive BioMedicine Online	6. 最初と最後の頁 163 ~ 170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.rbmo.2021.10.005	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 Kawashima Nozomu, Fukasawa Yoshie, Nishikawa Eri, Ohta-Ogo Keiko, Ishibashi-Ueda Hatsue, Hamada Motoharu, Ichikawa Daisuke, Narita Atsushi, Okuno Yusuke, Muramatsu Hideki, Nishio Nobuhiro, Kojima Seiji, Kato Taichi, Takahashi Yoshiyuki	4. 巻 27
2. 論文標題 Echocardiography Monitoring of Pulmonary Hypertension after Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Pediatric Pulmonary Arterial Hypertension and Pulmonary Veno-Occlusive Disease after Hematopoietic Stem Cell Transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transplantation and Cellular Therapy	6. 最初と最後の頁 786.e1 ~ 786.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtct.2021.05.017	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0件

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	加藤 太一 (KATO TAICHI) (20422777)	名古屋大学・医学系研究科・准教授 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------