

令和 4 年 4 月 22 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08555

研究課題名(和文) リアノジン受容体遺伝子異常による遺伝性心臓疾患の病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of pathology of inherited cardiac disease caused by mutations in ryanodine receptor gene

研究代表者

福山 恵 (Fukuyama, Megumi)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：60625771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：当施設に集積している遺伝性心臓疾患のコホートにおいて、遺伝性心臓疾患が疑われつつ原因遺伝子が同定できていない患者680名を抽出し、RYR2遺伝子変異を検索した結果、138名に変異を同定した。これらの患者の臨床像と心電図的特徴を解析した結果、86名のカテコラミン誘発多型性心室頻拍(CPVT)・27名のQT延長症候群(LQTS)・8名の特発性心室細動(IVF)に分類された。このうち86%が有症状であり、有症状の52%は致死的不整脈を呈していた。また、これらの表現型の違いは、機能解析にて機能取得型と機能喪失型に分かれ、リアノジン受容体蛋白上の変異アミノ酸の位置する箇所と関連していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リアノジン受容体は巨大蛋白であるため、心臓機能において重要な役割を果たすにもかかわらず遺伝子解析が複雑なものであった。本研究ではRYR2遺伝子の大規模な解析により、本遺伝子異常がもたらす臨床像は致死的不整脈を含む重篤なものが多く、早期診断と初期からの治療介入の重要性を示すものであった。また、バリエーションの部位や蛋白機能変化により臨床像が異なることを明らかにしたことで、バリエーションから患者の表現型や不整脈リスクを予測することができ、治療や安全管理の上で非常に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In a cohort of about 6,000 of inherited cardiac disease patients which we collected, we extracted 680 patients who were identified no mutation genes while exhibiting phenotypes of inherited cardiac disease, and screened for RYR2 gene variants. As the result, RYR2 variants were identified in 138 probands. As a result of analyzing the clinical and electrocardiographic characteristics in these RYR2 variant carriers, they were classified into 3 groups; 86 CPVT, 27 LQTS, and 8 IVF. 86% of them were symptomatic, overall, 52% of them experienced lethal arrhythmic events. These differences of phenotypes depend on protein function: gain-of-function in CPVT and loss-of-function in LQTS, and they seems to be related the position of variants in ryanodine receptor protein.

研究分野：遺伝性心臓疾患

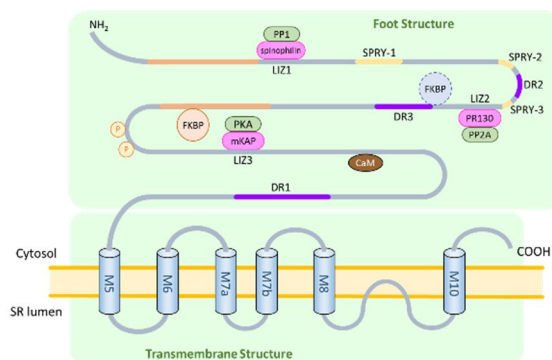
キーワード：リアノジン受容体遺伝子異常 QT延長症候群 カテコラミン誘発多型性心室頻拍

1. 研究開始当初の背景

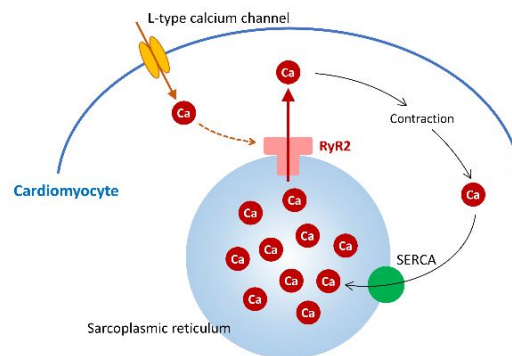
近年のゲノムプロジェクトをはじめとした分子生物学の発展により、この20年で遺伝性疾患の研究は格段に進化した。我々のグループはその黎明期より遺伝性不整脈分野の研究に携わっており、対象疾患はQT延長症候群(LQTS)、ブルガダ症候群、カテコラミン誘発性多型性心室頻拍(CPVT)、若年性心房細動、進行性伝導障害など多岐にわたる。

2019年の時点で我々の施設では世界的にも有数の約6,000人(約3,000家系)の遺伝性心臓疾患患者のコホートを集積していた。1990年代~2000年代までは対象疾患の多くが遺伝性不整脈症候群(IPAS)であったが、2010年代に入り、家族性の心筋症疾患も対象とするようになってきた。疾患は肥大型心筋症、拡張型心筋症、左室緻密化障害、不整脈源性右室心筋症など様々である。また、2015年より当施設に次世代シーケンサーMiSeqが導入され、心筋症パネルを用いた広範なスクリーニングが行えるようになったことで、心筋症患者からも多くの遺伝子変異が同定されるようになった。また、リアノジン受容体(RyR2)やサルコメア蛋白のような、従来のSanger法では複雑困難であった巨大蛋白の解析を広範に行うことも可能となった。

RyR2は約5,000アミノ酸残基より構成される分子量約550kDaの巨大タンパク質であり、そのホモ4量体により機能的なカルシウム放出チャネルが形成される。RyR2は約5000個ものアミノ酸から構成される巨大な構造をしており、筋小胞体・小胞体からのカルシウムイオンの放出を調節する細胞間カルシウムチャネル蛋白である。アミノ末端側が細胞質側に大きく張り出した領域を形成し(foot structure)、4本の膜貫通セグメントを含む残りのカルボキシル末端がチャネル領域を形成する(transmembrane structure)(図1)。心筋では、筋小胞体からのカルシウム誘発性カルシウム放出(Calcium-induced calcium release, CICR)が主な機構である(図2)。RyR2蛋白をコードするRYR2遺伝子変異によりアミノ酸置換が生じるとカルシウムイオンの遊離に異常が生じ、致死性の不整脈を起こす。これがCPVTである。我々は以前より、臨床的にカテコラミン誘発性多型性心室頻拍(CPVT)が疑われる患者に対してRYR2遺伝子の解析を行い、現在までに多数の患者に変異が同定されている。しかしながら、次世代シーケンサーを用いたスクリーニングを開始して以来、CPVT以外の遺伝性不整脈や心筋症、心不全などの患者にもRYR2遺伝子変異が同定されるようになった。



【図1】RyR2の構造



【図2】カルシウム誘発性カルシウム放出 (CICR)

2. 研究の目的

遺伝性不整脈の分野では、世界中の研究室が競ってその原因遺伝子と発症のメカニズムを解明している。その過程で、心筋症に由来した不整脈患者が多いという結果を得つつも、遺伝子変異と心筋症由来の不整脈との関連に関する研究は未だ発展途上である。我々の研究室に集積されているコホートは世界的にも有数のものであり国内では最大である。遺伝性不整脈のみならず、遺伝子が関与する心臓疾患について当施設で研究を遂行することは、日本人に特徴的な病態解明のためにも責務であると考えた。我々はこれまで、LQTSに対する原因遺伝子解析のように、疾患を中心に遺伝子解析を進めてきた。しかし遺伝子スクリーニング技術が大幅に発展した現在、遺伝子を中心に疾患との関連、解析、病態解明を行うことが可能になりつつある。本研究を通して、我々はRyR2が関与する遺伝性心臓疾患を同定し、同じようにRYR2遺伝子変異を有する患者の表現型がなぜ異なるのか、RyR2機能異常との関連も含めて病態を明らかにすることを目的とする。このことは、当該患者のみでなく次世代に至るまでリスク評価や早期の治療介入に

繋がる。また現在 RyR2 の関与が疑われつつも確立されていない疾患に関しても、関与を明らかにすることで治療法を確立できると考えられた。

3. 研究の方法

(1) 本研究課題では、まず、遺伝性心臓疾患が疑われる症例に対しての遺伝子スクリーニングが必要である。2019 年までに我々が集積した約 3,000 家系(6,000 名)のコホートから、遺伝性心臓疾患が疑われるにも関わらず原因遺伝子変異が同定されていない症例を抽出し、次世代シーケンサー(Target Genome Sequence)を用いて RyR2 蛋白をコードする *RYR2* 遺伝子を含む 56 種類の候補遺伝子の解析を行う。Target Gene Sequence にて変異が疑われた症例に対しては、direct sequence 法を用いて、遺伝子変異を確定する。

(2) *RYR2* 遺伝子変異が同定されたキャリアを CPVT/LQTS/不整脈源性右室心筋症(ARVC)/肥大型心筋症/拡張型心筋症など基礎疾患別に分類し、症状・生理学的検査所見など詳細な臨床像の収集及び解析を行う。また、LQTS や心筋症においては *RYR2* 遺伝子以外の原因遺伝子も報告されており、他の遺伝子変異キャリアとの臨床像の違いについても検討する。

(3) 同定された *RYR2* 遺伝子変異に伴う異常タンパクの解析も視野に入れる。解析法として、電気生理学的手法や iPS 由来心筋細胞を用いる。我々は京都大学循環器グループとの共同研究において、iPS 由来心筋細胞の解析を行っている。そこで培養細胞における機能解析において機能異常が同定された変異については、患者由来リンパ球から iPS 由来心筋細胞の樹立を行い、心筋の活動電位や心筋に発現しているタンパクとの相互作用について解析を行う。また *RYR2* 変異細胞のパッチクランプ法を用いた機能解析に関しては順天堂大学薬理学講座の呉林なごみ先任准教授が CPVT 症例などに関してすでに行っている。当施設との共同研究の体制がすでに確立されており、協力して解析を行っていく。

(4) 症例検討・遺伝子解析・パッチクランプ法や iPS 細胞を用いた電気生理学的解析については平行して研究をすすめる。解析結果と臨床症状が合致しないような場合には、それぞれの解析結果につき詳細に検討をすすめる。これらの研究の結果を実際の症例へフィードバックする。治療法を変更した場合、研究結果から予想された変化が実際に臨床的に観察されるのか検討を重ね、新規治療法の確立を目指す。

4. 研究成果

(1) 遺伝性心臓疾患が疑われる症例に対しての遺伝子スクリーニング:2019 年までに我々が集積した約 3,000 家系のコホートのうち、遺伝性心臓疾患が疑われるにも関わらず原因遺伝子変異が同定されていない家系は 680 家系であった。これらに対し世代シーケンサー(Target Genome Sequence)を用いて *RYR2* 遺伝子を含む 56 の候補遺伝子の解析を行った結果、138 名に *RYR2* 遺伝子バリエーションを同定した。

(2) *RYR2* 遺伝子バリエーションが同定されたキャリアを基礎疾患別に分類し、症状・生理学的検査所見など詳細な臨床像の収集及び解析を行った結果、86 名のカテコラミン誘発多型性心室頻拍(CPVT)・27 名の QT 延長症候群(LQTS)・8 名の特発性心室細動(IVF)に分類された(表 1)。このうち 86%が有症状であり、有症状の 52%は致死的不整脈を呈していた(図 3)。

【表 1 : *RYR2* 遺伝子バリエーションキャリアの臨床像】

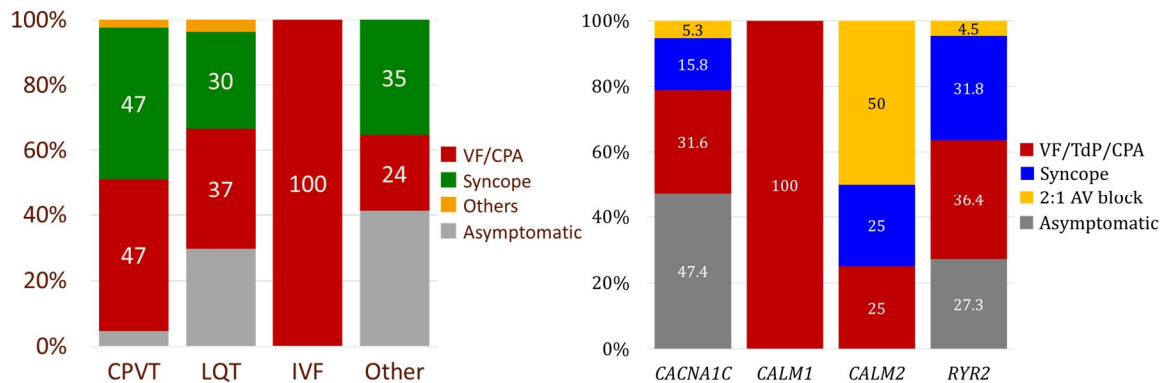
	Total	CPVT	LQTS	IVF	Other*
Number	138	86	27	8	17
Age of Diagnosis	21 ± 17	17 ± 11	20 ± 17	46 ± 26	36 ± 19
Male (%)	78 (57)	44 (51)	14 (52)	6 (75)	14 (82)
Symptomatic (%)	119 (86)	82 (95)	19 (70)	8 (100)	10 (59)
VF (% of symptomatic)	62 (52)	40 (49)	10 (53)	8 (100)	4 (40)
ECG measurements					
Mean Heart Rate (bpm)	68 ± 20	64 ± 16	79 ± 31	63 ± 14	71 ± 14
Mean QTc interval (ms)	439 ± 55	423 ± 39	508 ± 58	412 ± 28	419 ± 37

*This category included short coupled PVC, cardiac conduction disturbance, juvenile atrial fibrillation, etc.

VF; ventricular fibrillation

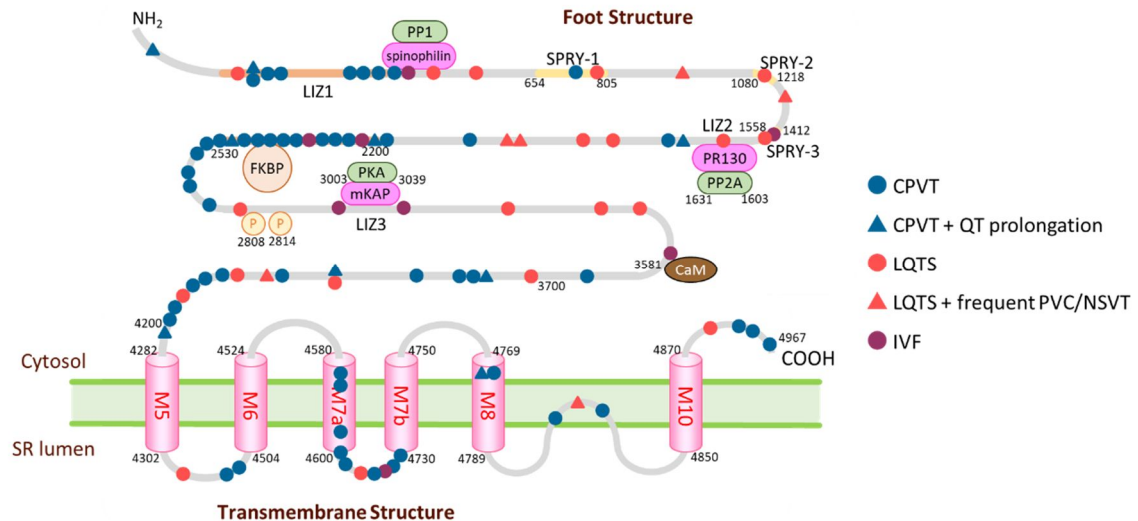
(3) LQTS 群に関しては *RYR2* 遺伝子以外の原因遺伝子も報告されており、*RYR2* と同様に心筋内のカルシウムイオンチャンネル蛋白の動態に関連する *CACNA1C*・*CALM* 遺伝子バリエーションキャリアとの臨床像の違いについても検討した。結果、*CACNA1C* バリエーションキャリアと比較して *RYR2* バリエーションキャリアの方が有症状の割合が高かった(図 4)。

【図 3： *RYR2* 遺伝子バリエーションキャリアの症状内訳】 【図 4： LQTS における *RYR2*・*CACNA1C*・*CALM* 遺伝子変異キャリアの症状比較】



(4) *RYR2* 遺伝子バリエーションによる表現型の違いに関して、CPVT では変異 *RYR2* 蛋白による機能獲得型の異常を呈することは既に明らかとなっているが、我々と共同研究グループによるリアノジン受容体変異蛋白の機能解析により、LQTS の患児では機能喪失型の異常が確認された。共同著者としてこの結果に関する論文報告に助力した(Hirose, et al. EP Europace, 24(3) 2022)。また、これらの機能異常の違いはリアノジン受容体蛋白上の変異アミノ酸の位置する箇所と関連していると考えられた(図 5)。

【図 5： リアノジン受容体蛋白におけるバリエーションの位置と臨床像】



(5) 前述の(1)から(3)の解析過程に派生して、学校健診における LQTS 関連遺伝子変異(*RYR2* を含む)と心電図所見との関連について報告した(Fukuyama, et al. EP Europace, 2022, In press)。また、*RYR2* を主な原因遺伝子変異とする CPVT の診断についての論文報告に共著者として助力した(Shimamoto, et al. Heart, 2022, In press)。

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 Megumi Fukuyama, Minoru Horie, Hisaaki Aoki, Junichi Ozawa, Koichi Kato, Yuichi Sawayama, Sachiko Tanaka-Mizuno, Takeru Makiyama, Masao Yoshinaga, Yoshihisa Nakagawa, Seiko Ohno	4. 巻 In press
2. 論文標題 School-based routine screenings of electrocardiograms for the diagnosis of long QT syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 EP Europace	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/europace/euab320	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 Keiko Shimamoto, Seiko Ohno, Koichi Kato, Koichiro Takayama, Keiko Sonoda, Megumi Fukuyama, Takeru Makiyama, Satoshi Nagase, Kengo Kusano, Minoru Horie, Takeshi Aiba	4. 巻 In press
2. 論文標題 Impact of cascade screening for catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia type 1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heart	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/heartjnl-2021-320220	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 Sayako Hirose, Takashi Murayama, Naoyuki Tetsuo, Minako Hoshiai, Hiroaki Kise, Masao Yoshinaga, Hisaaki Aoki, Megumi Fukuyama, Yimin Wuriyanghai, Yuko Wada, Koichi Kato, Takeru Makiyama, Takeshi Kimura, Takashi Sakurai, Minoru Horie, Nagomi Kurebayashi, Seiko Ohno	4. 巻 24
2. 論文標題 Loss-of-function mutations in cardiac ryanodine receptor channel cause various types of arrhythmias including long QT syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 EP Europace	6. 最初と最後の頁 497-510
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/europace/euab250	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 Seiko Ohno, Junichi Ozawa, Megumi Fukuyama, Takeru Makiyama, Minoru Horie	4. 巻 65
2. 論文標題 An NGS-based genotyping in LQTS; minor genes are no longer minor.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 1083-1091
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s10038-020-0805-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 Koichi Kato, Seiko Ohno, Keiko Sonoda, Megumi Fukuyama, Takeru Makiyama, Tomoya Ozawa, Minoru Horie	4. 巻 13
2. 論文標題 LMNA Missense Mutation Causes Nonsense-Mediated mRNA Decay and Severe Dilated Cardiomyopathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circulation Genomic Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 435-443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCGEN.119.002853	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 Yuichi Sawayama, Takashi Yamamoto, Yukinori Tomita, Kohei Asada, Noriaki Yagi, Megumi Fukuyama, Akashi Miyamoto, Hiroshi Sakai, Tomoya Ozawa, Tetsuichiro Isono, Daiki Hira, Tomohiro Terada, Minoru Horie, Yoshihisa Nakagawa	4. 巻 84
2. 論文標題 Comparison Between Clopidogrel and Prasugrel Associated With CYP2C19 Genotypes in Patients Receiving Percutaneous Coronary Intervention in a Japanese Population	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 1575-1581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-20-0254	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 Fukuyama M, Ohno S, Ozawa J, Kato K, Makiyama T, Nakagawa Y, Horie M.	4. 巻 84
2. 論文標題 High Prevalence of Late-Appearing T-Wave in Patients With Long QT Syndrome Type 8	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 559-568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-19-1101	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 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Megumi Fukuyama, Minoru Horie, Koichi Kato, Takeru Makiyama, Seiko Ohno, Yoshihisa Nakagawa
2. 発表標題 Calmodulinopathy is a Common Cause of Critical Cardiac Phenotypes in Fetus and Infancy
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fukuyama M, Ohno S, Kato K, Ozawa T, Makiyama T, Nakagawa Y, Horie M.
2. 発表標題 Contribution of Genetic Screening for Arrhythmogenic Cardiomyopathy
3. 学会等名 第67回日本不整脈心電学会学術集会.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sonoda K, Nagase S, Aiba T, Fukuyama M, Kato K, Kusano K, Horie M, Ohno S.
2. 発表標題 Early onset of heart failure in Japanese ARVC patients with pathogenic desmosomal gene variants
3. 学会等名 ESC Congress 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Megumi Fukuyama, Seiko Ohno, Koichi Kato, Tomoya Ozawa, Yuichi Sawayama, Yosuke Higo, Yusuke Okuyama, Kohei Asada, Yusuke Fujii, Noriaki Yagi, Akashi Miyamoto, Hiroshi Sakai, Takashi Yamamoto, Takeru Makiyama, Minoru Horie, Yoshihisa Nakagawa
2. 発表標題 Contribution of Genetic Screening for Arrhythmogenic Cardiomyopathy
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会総会 with WCC2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuichi Sawayama, Koichi Kato, Masahiko Ajiro, Ryo Kurosawa, Megumi Fukuyama, Seiko Ohno, Yoshihisa Nakagawa, Minoru Horie
2. 発表標題 A Synonymous SCN5A Variant p.E446E Causing Brugada Syndrome via Cryptic Donor Site Splicing
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会総会 with WCC2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuichi Sawayama, Takashi Yamamoto, Yousuke Higo, Kohei Asada, Noriaki Yagi, Megumi Fukuyama, Akashi Miyamoto, Yoshihisa Nakagawa
2. 発表標題 Association between CYP2C19 Polymorphism and High Bleeding Risk in Patients Received Percutaneous Coronary Intervention
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会総会 with WCC2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fukuyama M, Ohno S, Ozawa J, Kato K, Takayama K, Makiyama T, Horie M
2. 発表標題 High Prevalence of Late Appearance T Wave in Patients with Long QT Syndrome Type 8
3. 学会等名 第 66 回日本不整脈 心電学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fukuyama M, Ohno S, Ozawa J, Horie M
2. 発表標題 Calmodulin Mutations in Japanese Children with Long QT Syndrome
3. 学会等名 第 66 回日本不整脈心電学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asada K, Sawayama Y, Yagi N, Fukuyama M, Sakai H, Yamamoto T, Nakagawa Y.
2. 発表標題 A severely calcified coronary lesion that a burr cannot penetrate
3. 学会等名 CCT2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤山裕一 浅田紘平, 八木典章, 福山 恵, 宮本 証, 酒井 宏, 山本 孝, 中川義久
2. 発表標題 A case of successful recanalization of thrombotic occlusion of the external iliac artery
3. 学会等名 CCT2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅田紘平, 澤山裕一, 八木典章, 福山 恵, 宮本 証, 酒井 宏, 山本 孝, 中川義久
2. 発表標題 DCB versus DES in STEMI.
3. 学会等名 PAC19
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植村裕樹, 福山 恵, 酒井 宏, 山本 孝, 中川義久
2. 発表標題 常染色体優性多発性嚢胞腎に合併した重症心不全の 1 例
3. 学会等名 日本内科学会第 226 回近畿地方会
4. 発表年 2019年

〔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	大野 聖子 (Ohno Seiko) (20610025)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長 (84404)	

6. 研究組織（つづき）

	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	堀江 稔 (Horie Minoru) (90183938)	滋賀医科大学・医学部・非常勤講師 (14202)	

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