

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：平成 21 年度 ～ 平成 23 年度

課題番号：21590921

研究課題名（和文） 進行性心臓伝導障害におけるギャップジャンクションの遺伝子異常と分子病態の解明

研究課題名（英文） Mutations in cardiac gap junction genes and the pathophysiology underlying progressive cardiac conduction defect.

研究代表者：蒔田 直昌 (MAKITA NAOMASA)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00312356

研究成果の概要（和文）：進行性心臓伝導障害(Progressive cardiac conduction disturbance; PCCD)の病態を明らかにするために、国際症例登録を行い PCCD の臨床的特徴を解析した。また、遺伝子解析によって、PCCD の 1 家系にコネキシン 40(Cx40)の変異を同定した。Cx40 チャンネルは単一チャンネルコンダクタンスの低下と細胞膜上でのサブユニットのクラスターリング異常を示した。PCCD の新たな分子病態として、心筋ギャップジャンクションによる刺激伝導細胞間の伝導障害が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the pathophysiology underlying the progressive cardiac conduction defect (PCCD), PCCD family members were registered, and the clinical features were analyzed. Genetic screening revealed a novel mutation in a gene encoding connexin40 (Cx40). The mutant Cx40 showed reduced single channel conductance and impaired plaque formation at the plasma membrane. These data demonstrates that the abnormal cell-cell coupling at the cardiac conduction system is a novel pathophysiology underlying PCCD.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|----------|-----------|-----------|-----------|
| 平成 21 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 平成 22 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 平成 23 年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：循環器内科学

キーワード：ギャップジャンクション・致死性不整脈・心臓伝導障害・遺伝子

1. 研究開始当初の背景

近年の分子遺伝学の目覚ましい発達によって、致死性不整脈の原因遺伝子が次々と明らかになり、その多くは、心筋活動電位を形成するイオンチャンネルまたはその調整因子を原因とすることが判明した。進行性心臓伝導障害(Progressive cardiac conduction disturbance; PCCD)は、心臓刺激伝導系の進行性変性によって突然死をきたす遺伝性不

整脈で、一部の家系に心筋 Na チャンネルの遺伝子異常が判明しているものの、詳細な病態メカニズムは未解明である。研究代表者は最近、CCD の日本人 1 家系に、心房・刺激伝導系に特異的なギャップジャンクション(GJ)「コネキシン 40」の遺伝子異常を同定した。GJ は心筋における細胞間刺激伝導ネットワークを担う重要な膜タンパクだが、これまで心疾患の GJ 遺伝子変異は報告さ

れていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1) 多民族・多家系の遺伝子解析によって、GJの遺伝子異常による新しい範疇の致死性不整脈の存在を明らかにし、2) 電気生理学的・細胞分子生物学的手法によって、心臓伝導障害の分子メカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

(1) PCCDの国際登録と臨床解析

国内外の共同研究体制を構築し症例登録し、臨床解析し、遺伝子解析と比較することによって、予後判定のデータベースを構築した。

(2) 遺伝子解析

心筋イオンチャンネル遺伝子 (*KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE1*, *KCNE2*, *HCN4*, *SCN1B*, *SCN2B*, *SCN3B*, *SCN4B*) ギャップジャンクション遺伝子 (*GJA1*, *GJA5*, *GJC1*)、ラミン A/C (*LMNA*)、転写因子 (*NKX2.5*, *IRX3*) の遺伝子解析を行った。

(3) 変異の機能解析

SCN5A 変異は whole-cell パッチクランプ法で Na 電流を測定し、GJA5 変異は double whole-cell パッチクランプ法で全細胞・単一チャンネル解析を行い、共焦点顕微鏡で局在以上の解析を行った。

4. 研究成果

器質的心疾患を持たない本邦 PCCD 発端者 47 人と家族 16 人を登録し、その臨床像と遺伝子変異を解析した。平均 11.6 年 (0.3-33 年) の観察期間に、7 人 (14.9%) が突然死、21 人 (33.3%) が心不全を発症し、44 人 (70%) がペースメーカーまたは除細動器の埋め込術を要した。遺伝子解析では、心筋 Na チャンネル *SCN5A* (9)、心筋 K チャンネル *KCNH2* (1)、拡張型心筋症の原因遺伝子である核膜タンパクラミン A/C *LMNA* (9) の変異が同定された。さらに、2 例の突然死を伴う若年性悪性 PCCD 1 家系において、心房筋と刺激伝導系に特異的に発現するギャップジャンクション (GJ) connexin40 (Cx40) の遺伝子変異 Q58L を同定した。内因性 GJ を欠損する細胞 N2A に Q58L cDNA を発現させ、細胞間コンダクタンスをダブルパッチクランプ法で測定すると、Q58L 細胞ペアのコンダクタンスは正常 Cx40 の 1/10 に減弱していた (正常 = 12.9 ± 5.8 nS, Q58L = 1.2 ± 0.7 nS; $p < 0.01$)。また、Q58L は細胞膜上にびまん性に発現しており、膜の一部に集簇する正常の発現パターンが障害されており、コネクソンサブユニット間の連関異常が示唆された。本変異は、心血管疾患における GJ 遺伝子の生殖系列変異としては最初の報告である。一方、LMNA のキャリア 9 例はいずれも登録時には心不全はなく、経過中に 78% が心不全を合併した。以上より PCCD は心

筋活動電位を形成するイオンチャンネル、細胞間伝導にかかわるイオンチャンネル、核膜タンパクなどを原因とする複雑な病態で、たとえばある時期に心機能異常が正常でもその後拡張型心筋症に進展する可能性があることが判明した。

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 38 件)

1. Makita N (査読有) Phenotypic Overlap of Cardiac Sodium Channelopathies: Individual-specific or mutation-specific? *Circ J* 73 : 810-817, 2009
2. Kamakura S, Makita N, et al (査読有, 22 人中 11 番目) Long-term Prognosis of Probands with Brugada-pattern ST-elevation in leads V1-V3. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2:495-503, 2009
3. Sato A, Makita N, et al (査読有, 8 人中 3 番目) Novel mechanisms of trafficking defect caused by KCNQ1 mutations found in long QT syndrome. *J Biol Chem* 284 : 122-133, 2009
4. Okishige K, Makita N, et al (査読有, 11 人中 11 番目) Aborted Sudden Cardiac Death Associated with Short QT Syndrome. *J Arrhythmia* 25 : 214-218, 2009
5. Noto N, Sumitomo N, et al (査読有, 7 人中 5 番目) Age-Related Acceleration of Endothelial Dysfunction and Subclinical Atherosclerosis in Subjects with Coronary Artery Lesions After Kawasaki Disease. *Ped Cardiol* 30 : 262-8, 2009
6. Kanamaru H, Sumitomo N, et al (査読有, 8 人中 9 番目) Dual myocardial scintigraphy mismatch in an infant with Bland-White-Garland syndrome. *Int J Cardiol* 12 : e1-3, 2009
7. Sumitomo N, et al (査読有, 4 人中 1 番目) Decremental accessory pathway conduction after ablation and antidromic atrio-ventricular reciprocating tachycardia 8 years after successful radiofrequency ablation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 20 : 818-821, 2009
8. Horigome H, Sumitomo N, et al (査読有, 22 人中 3 番目) Clinical characteristics and genetic background of congenital long QT syndrome diagnosed in fetal, neonatal and infantile life. A nation-wide questionnaire survey in Japan. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 3 : 10-17, 2010
9. Sumitomo N (査読無) Correction of QT interval in children. *Circ J* 75 : 1534-1535,

- 2010
10. Sumitomo N, et al (査読有, 7人中1番目) Clinical effectiveness of pulmonary vein isolation for arrhythmic events in a patient with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Heart Vessels* 25 : 448-452, 2010
 11. Abe O, Sumitomo N, et al (査読有, 10人中7番目) Quantitative evaluation of coronary artery wall echogenicity by integrated backscatter analysis in Kawasaki disease. *J Am Soc Echocardiogr* 23 : 938-42, 2010
 12. Sumitomo N (査読無) Are there Juvenile and Adult types in patients with Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia? *Heart Rhythm* 8 :872-873, 2011
 13. Noto N, Sumitomo N, et al (査読有, 9人中8目) Changes in the Textural Characteristics of Intima-Media Complex in Young Patients with Familial Hypercholesterolemia: Implication for Visual Inspection on B-Mode Ultrasound. *J Am Soc Echocardiogr* 24 : 438-43, 2011
 14. Watanabe H, Makita N, et al (査読有, 27人中27番目) Electrocardiographic Characteristics and SCN5A Mutations in Idiopathic Ventricular Fibrillation Associated with Early Repolarization. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 4 : 874-881, 2011
 15. Watanabe H, Makita N, et al (査読有, 5人中4番目) Electrocardiographic abnormalities and risk of complete atrioventricular block. *Int J Cardiol* 155 : 462-464, 2012
 16. Makita N, Seki A, Sumitomo N, et al (査読有, 22人中1,2,3番目) A Connexin 40 Mutation Associated with a Malignant Variant of Progressive Familial Heart Block Type-1. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 5 : 163-172, 2012
 17. Delmar M, Makita N. (査読有) Cardiac connexins, mutations and arrhythmias. *Curr Opin Cardiol.* : 236-241, 2012
 18. Watanabe H, Makita N, et al (査読有, 27人中27番目) Response to Letter Regarding Article, "Electrocardiographic Characteristics and SCN5A Mutations in Idiopathic Ventricular Fibrillation Associated With Early Repolarization" *Circ Arrhythm Electrophysiol* 5 : e60-e61, 2012
 19. Fukushima N, Seki A, et al (査読有, 12人中7番目) A crucial role of activin A-mediated growth hormone suppression in mouse and human heart failure. *PLoS One.* 6 : e27901, 2011
 20. Fukuhara J, Sumitomo N, et al (査読有, 12人中2番目) Electrophysiological characteristics of idiopathic ventricular tachycardia in children. *Circulation Journal* 75 : 672-676,2011
 21. Ichikawa R, Sumitomo N, et al (査読有, 11人中2番目) The follow-up evaluation of electrocardiogram and arrhythmias in children with fulminant myocarditis. *Circulation Journal* 75 : 932-938, 2011
 22. Horigome H, Sumitomo N, et al (査読有, 6人中5番目) Detection of extra-components of T wave by independent component analysis in congenital long QT syndrome. *Circulation Arrhythmia and Electrophysiology* 4 : 456-464, 2011
 23. Christian van der Werf, Sumitomo N, et al (査読有, 17人中8番目) Flecainide therapy reduces exercise-induced ventricular arrhythmias in patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Journal of the American College of Cardiology* 57 : 2244-2254, 2011
 24. Chinen S, Sumitomo N, et al (査読有, 6人中6番目) Life-threatening Atrial Tachycardia after the Senning Operation in a Patient with Transposition of the Great Arteries. *Heart and Vessels* 26 In press
 25. Nakashima K, Sumitomo N, et al (査読有, 7人中7番目) A left ventricular non-compaction in a patient with long QT syndrome caused by a KCNQ1 mutation – a case report – *Heart and Vessels* 26 In press
 26. 蒔田直昌 (査読無) 難治性不整脈の遺伝子検査 *Heart View* 13 : 32-8,2009
 27. 蒔田直昌 (査読無) 心電学マイルストーン 日本心電学会誌 29 : 355,2009
 28. 松村昌治、住友直方 (査読無, 2人中2番目) 心室頻拍小児科診療 72 : 920-930, 2009
 29. 住友直方 (査読無) 若年者運動誘発性心室細動 *Jpn J Electrocardiol* 20 : 818-821,2009
 30. 蒔田直昌 (査読無) カルシウム拮抗薬不整脈における使い方 *Heart View* 14 : 111-115,2010
 31. 住友直方 (査読無) 乳児の副伝導路に対するカテーテルアブレーション: 危険性と利点 日本小児循環器学会雑誌 27 : 21-22,2010
 32. 住友直方、他 (査読無, 10人中1番目) 小児不整脈の診断・治療ガイドライン 日本小児循環器学会雑誌 26 (supplement) : 1-62,2010
 33. 蒔田直昌 (査読無) 不整脈とイオンチャネル病 ここまで進んだ不整脈研究の最新動向 5-12,2011

34. 蒔田直昌 (査読無) 遺伝性心臓伝導障害の分子基盤 循環器内科 70 : 460-46,2010
35. 蒔田直昌 (査読無) 致死性不整脈の基礎と臨床－特発性心室細動－ 臨床と研究 88 : 127-129,2011
36. 蒔田直昌 (査読無) 後天性 QT 延長症候群の新しい展開 不整脈+PLUS 3-8,2011
37. 蒔田直昌 (査読無) 不整脈とイオンチャネル病 別冊・医学のあゆみ 5-12,2011
38. 蒔田直昌 (査読無) 特発性心室細動と J 波症候群の遺伝子診断 CIRCULATION Up-to-Date 7 : 20-25,2012

[学会発表] (計 32 件)

1. Makita N : Overlap between LQT3 and Brugada Syndrome: Clinical Features in a Common Mutation and Underlying Biophysical Mechanisms : 13th Congress of International Society for Holter and Noninvasive Electrocardiology , 2009.6.5 , 横浜
2. Yamagata K, Makita N, et al : Clinical Phenotype of Japanese LQT3 Form of Congenital Long QT Syndrome by Location and Coding Type from Japanese Multicenter Registry : 13th Congress of International Society for Holter and Noninvasive Electrocardiology , 2009.6.5 , 横浜
3. Makita N, Sumitomo N, Seki A, et al : Familial isolated cardiac conduction defect associated with a mutation in the connexin40 gene GJA5 : The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, 2009.7.27-8.1 , 京都
4. Yamagata K, Makita N, et al : Clinical Phenotype and Prognosis of Proband With Brugada Syndrome in Relation to SCN5A Mutation.-Japanese Brugada Syndrome Multicenter Registry : American Heart Association Scientific Sessions 2009 , 2009.11.18 , Orlando, USA
5. Nakamura T, Sumitomo N, et al : Alfa Adrenergic Responses in Patients with Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia : 13th International Society for Holter and Noninvasive Electrocardiology 2009 , 2009.6.4-6 , 横浜
6. Iguchi H, Sumitomo N, et al : Successful tricuspid and mitral isthmus ablation in an infant with right and left atrial flutter : 5th World Congress of Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery , 2009.6.21-26 , Cairns, Australia
7. Matsumura T, Sumitomo N, et al : The electrophysiological change of fast pathway property after slow pathway ablation in patients with atrio-ventricular nodal reentrant tachycardia : 5th World Congress of Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery , 2009.6.21-26 , Cairns, Australia
8. Sumitomo N : Clinical manifestations and therapeutic strategy for patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, in Clinical Expression of Inherited Ventricular Arrhythmia : 2nd Asian Pacific Heart Rhythm Society , 2009.10.22-29 , Beijing, China
9. Makita N, et al : Overlap Between LQT3 and Brugada Syndrome : Clinical Features in a Common Mutation and Underlying Biophysical Mechanisms. : 第 24 回日本不整脈学会学術大会・第 26 回日本心電学会学術集会 合同学術集会 , 2009.7.3 , 京都
10. Makita N : Special Session Molecular Basis of Congenital Long QT and Related Arrhythmia Syndromes : 第 74 回日本循環器学会総会・学術集会 , 2010.3.6 , 京都
11. 住友直方 : 乳児のカテーテルアブレーション : カテーテルアブレーション関連秋季大会 2009 , 2009.10.16-18 , 川越
12. Makita N : Molecular genetics of Brugada syndrome. : XXth World Congress of the International Society for Heart Research 2010 Kyoto , 2010.5.13 , Kyoto
13. Makita N : Cardiac Conduction Disturbance and Connexins. : The 3rd Asia-Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session , 2010.10.30 , Jeju Korea
14. Arimura T, Makita N, et al : Novel Mechanisms of Trafficking Defect Caused by KCNQ1 Mutations Found in Long QT Syndrome. : The 3rd Asia-Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session , 2010.10.29 , Jeju Korea
15. Sato A, Makita N, et al : Novel Mechanisms of Trafficking Defect Caused by KCNQ1 Mutations Found in Long QT Syndrome : The 3rd Asia-Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session , 2010.10.30 , Jeju Korea
16. Makita N, Schot,J-J : Molecular basis of cardiac conduction defect. : Annual European - SAKURA meeting - , 2010.12.6 , Nantes France
17. Watanabe H, Makita N, et al : Electrocardiographic risk factors for complete atrioventricular block : The Niigata Preventive Medicine Study : American Heart Association Scientific Sessions 2010 , 2010.11.16 , Chicago USA.
18. Makimoto H, Makita N, et al : Clinical Features of Congenital Long QT Syndrome in Pre-elementary-age Children : American

- Heart Association Scientific Sessions 2010 , 2010.11.15 , Chicago USA
19. Makita N : Genetic basis of age-dependent manifestation of cardiac conduction defect : The 3rd Nagasaki-Hallym International Joint Meeting on Aging and Neurodegenerative Diseases , 2010.11.29 , 長崎
 20. Sumitomo N Recent topics of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia : The 3rd Asia-Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session , 2010, 10.27-30 , Jeju, Korea
 21. 蒔田直昌 : 致死性不整脈の基礎と臨床 : 第 96 回日本循環器学会中国・四国合同地方会 , 2010.6.11 , 鳥取
 22. 蒔田直昌 : Brugada 症候群とその類縁疾患の病態 : 第 27 回日本心電学会学術集会ランチョンセミナー , 2010. 10. 8 , 大分
 23. 蒔田直昌 : 心電図 QT 時間の遺伝的素因 : 第 27 回日本心電学会学術集会モーニングセミナー , 2010.10.9 , 大分
 24. 住友直方 : 学校管理下の突然死と小児不整脈 : 第 26 回春日部小児科医会 , 2010.6.15 , 春日部
 25. Makita N : Functional Basis of Type 3 Long QT Syndrome. : The 75th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2011.8.4 , Yokohama
 26. Makita N, et al : Clinical Features and Genetic Basis of Progressive Cardiac Conduction Defect: Japanese PCCD Registry. : 4th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session , 2011.9.20 , Fukuoka
 27. Makita N : Molecular and Physiological Basis of Familial Progressive Heart Block Type-I : The 1st HD Physiology International Symposium , 2012.1.21 , Tokyo
 28. Makita N : Genetic Diagnosis of Hereditary Lethal Arrhythmias : The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society , 2012.3.17 , Fukuoka
 29. Makita N, et al : Clinical features and Genetic Basis of Progressive Cardiac Conduction Defect: Japanese PCCD Registry. : 26th Annual Scientific Session of the Japanese Society of Electrocardiology , 2011.9.20 , Fukuoka
 30. Sumitomo N : Management of tachycardias in children with structurally normal hearts: VT in structurally normal hearts : 45th Annual Meeting of the Association of European Paediatric Cardiology , 2011.5.19 , Granada, Spain

31. Sumitomo N : Subtypes and management of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular tachycardia : The 4th Asia-Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session , 2011.9.19-22 , Fukuoka
32. Sumitomo N, et al : Recent advancement of treatment in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia : The 4th Asia-Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session , 2011.9.19-22 , Fukuoka

〔図書〕 (計 8 件)

1. 蒔田直昌 : Medical View : Brugada 症候群 , 2009 , 224-233
2. 蒔田直昌 : Medical View : 失神を究める , 2009 , 215-224
3. 蒔田直昌 : 最新医学社 : 心臓突然死 , 2009 180-189
4. 蒔田直昌 : 中山書店 : Brugada 症候群 , 2010 , 143-147
5. 住友直方 : 最新医学社 : 新しい診断と治療の ABC , 2009 , 96-104
6. 蒔田直昌 : 西村書店 : 循環器病学 基礎と臨床 , 2010 , 382-393
7. Makita N : Springer : Genes and Cardiovascular Function , 2011 , 185-196
8. 住友直方 : 医学書院 : 今日の小児治療指針第 15 版 , 2012 , 1028

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

蒔田 直昌 (MAKITA NOMASA)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号 : 00312356

(2)研究分担者

関 明子 (SEKI AKIKO)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 80408608
住友 直方 (SUMITOMO NAOKATA)
日本大学・医学部・准教授
研究者番号 : 50231379

(3)連携研究者

なし