

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03211

研究課題名（和文）心臓突然死剖検例に対する網羅的遺伝子，形態解析

研究課題名（英文）Comprehensive genetic and morphological analysis for sudden cardiac death autopsy cases

研究代表者

畑 由紀子（Hata, Yukiko）

富山大学・学術研究部医学系・准教授

研究者番号：30311674

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：心臓突然死剖検例の死因究明において、病理組織学的検索と次世代シーケンスを用いた遺伝子解析の併用が有効であることを示した。未診断であった35症例を含む65例の心臓突然死剖検例を対象に、全エクソーム解析を通じて多様な稀少変異を特定し、機能解析や病理組織学的再評価を実施した。その結果、7例が既知の心筋症やチャネル異常症と診断され、15例を用いて病因や病態について論文報告した。本研究は、突然死の病因・病態解明における病理組織学的検索と遺伝子解析の併用の重要性を示し、診断プロトコールの改良の基盤を築くことに貢献した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓突然死の死因究明において、病理組織学的検索と次世代シーケンスを用いた遺伝子解析の併用が有効であることを示した。これにより、新たな病原性遺伝子変異の特定とその機能評価を通じて、心臓突然死の病因・病態の解明に寄与することができた。また、心臓突然死に関する診断基準の精度向上や、今後の研究の基盤を築く一助となった。診断精度の向上により、早期対応が可能となり、ご遺族への予防策の確立が期待される。さらに、社会全体の突然死予防に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The combined use of histopathological search and genetic analysis using next-generation sequencing was shown to be effective in determining the cause of death in autopsy cases of sudden cardiac death. In 65 autopsy cases of sudden cardiac death, including 35 undiagnosed cases, a variety of rare mutations were identified through whole exome analysis, and functional analysis and histopathological re-evaluation were performed. As a result, seven cases were diagnosed as known cardiomyopathies or channelopathies, and 15 cases were used to report the etiology and pathogenesis in a paper. This study demonstrated the importance of combining histopathological search and genetic analysis in elucidating the etiology and pathogenesis of sudden death and contributed to laying the foundation for improved diagnostic protocols.

研究分野：法医学

キーワード：突然死 エクソーム解析 病理組織学的検索 遺伝子変異 次世代シーケンサー

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

法医学解剖例では、小児や若青年者の突然死のうち、器質的疾患が特定されない症例が3%から40%存在し、多くの場合原因不明の不整脈性心臓突然死とされる (Tester D et al. Curr Opin Cardiol 2006)。突然死は無症候で初発症状となることが多く、家族にとっても悲劇的であるため、早急な原因特定と予防が求められている。

近年、QT延長症候群やBrugada症候群などの不整脈性疾患が注目され、初期にはサンガーシーケンス法でチャンネル関連遺伝子の検索が行われた。我々もQT延長症候群の突然死例で新規KCNH2遺伝子の変異を検出した (Hata Y et al. Int J Legal Med 2014)。しかし、サンガーシーケンス法での変異検出頻度は約35%と低かった (Semsarian C et al. Eur Heart J 2015)。

次世代シーケンサー(NGS)の登場により、大量の遺伝子解析が短時間で可能となり、当教室でも心疾患関連遺伝子のパネルシーケンスを行っている。また、突然死者の同胞は突然死の危険度が高いことから (Jorven X et al. Circulation 1999)、遺族が希望する場合は大学病院などでの診察と遺伝子解析を行っている (図1)。

これまでの遺伝子検査では、病原変異体特定に至ったのは約半数であり、未特定例は「変異体が発見されなかった」か「病原性を証明できなかった」症例に分かれた。この結果を踏まえ、NGSを用いた網羅的な遺伝子解析や挿入・欠失、コピー数変異の検索が必要と考えた。また、病原性証明には高度なコンピュータ解析、機能解析、家族解析の併用が必要である。

さらに、心臓突然死の中には早期心筋症や心筋伝導障害関連遺伝子異常を有する症例が多く、軽微な病理変化を有する症例も認められた (Hata Y et al. Heart Rhythm 2016, Brain Pathol 2017, Mod Pathol 2019)。病理組織学的検査が剖検の基本であり、遺伝子異常に関連する病理組織学的所見の描出は重要である。この取り組みは、突然死の剖検診断システムの構築や病態解明に重要な役割を果たすと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、心臓突然死例、特に明らかな器質的疾患が特定されない心臓突然死例の効果的、効率的な分子遺伝学的検索手法の確立と、変異体検出例において軽微であっても有意な病理学的変化が発生していることを証明し、その結果を基にして、遺族の突然死予防まで含めた診断プロトコルを作成することである。

3. 研究の方法

これまでに構築した診断プロトコル (図1) に従って、肉眼から組織学的観察、生化学、薬毒物、遺伝子検査などを行なった。

(1). 対象

2007-2023年度のこれまで未診断であった35症例を含む心臓突然死剖検例65例を対象とした。

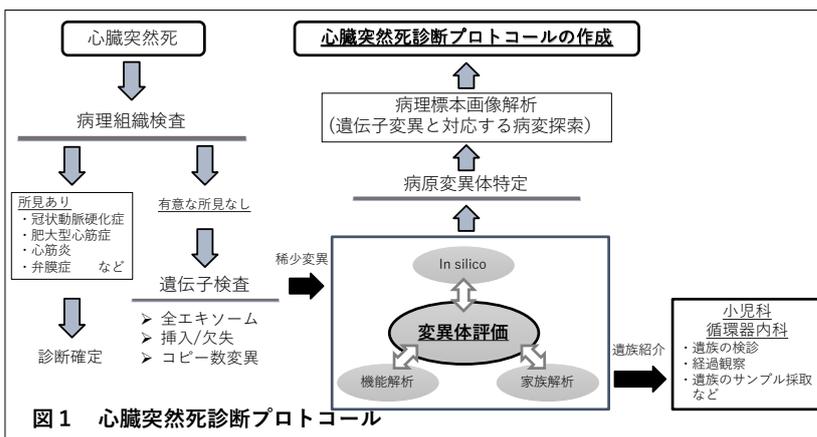


図1 心臓突然死診断プロトコル

用いてマッピング、変異検出、検出された変異へのアノテーションを行った。

② 遺伝子解析

得られたバリエーションについて、日本人の健常人の頻度データベース ToMMo, Human Genetic Variation Database を用いた稀少変異 (頻度の1%以下) の抽出、関連する疾患のデータベース ClinVar, Human Gene Mutation Database (HGMD) を用いた検索、米国臨床遺伝・ゲノム学会のガイドラインに従った評価、CADD を用いて病原性の評価を行った。また、Human Phenotype Ontology (HPO) を用いて心疾患関連遺伝子など疾患別に分類し解析も行った。オミクスデータを活用するためにパスウェイデータベース KEGG, Reactome, オリゴジェニック予測サイト、遺伝子優先順位付けサイトを用いて異常経路の推定を試みた。検出された病原性遺伝子に関してはサンガーシーケンスで変異を確認した。

③ 機能解析

スプライシング機構の破綻が予測される遺伝子変異は、HEK293T 培養細胞を用いた mini-gene

(2). 遺伝子解析

剖検時採取した血液からDNAを抽出し、全エクソーム解析を施行した。

① 全エクソーム解析

アジレント社の SureSelect キットと illumina 社シーケンサーで解析したデータについて、次世代シーケンズデータ解析用ソフトウェア CLC Genomics Workbench を

assay を行うことで、遺伝子変異による機能の変化を検証した。

(3). 病理形態学的評価

① 標本作製, 画像解析

剖検時摘出した心臓は冠状動脈の間隔連続切片, 乳頭筋レベルの左右心室横断面, 洞房結節, 房室伝導系の標本作製し, ヘマトキシリンエオジン染色, エラスティカ・マッソン染色を施行した。

② 画像解析

エラスティカ・マッソン染色を施行した左心室, 右心室, 洞房結節, 房室結節, ヒス束を含む標本をバーチャルスライドシステム (Leica APERIO AT TURBO) にてコンピューター内に取り組み, 画像解析ソフト (ImageJ) にて, 刺激伝導系の線維組織の総量と標本中の比率を算出した。

③ 統計

病理学的所見の解析 統計解析は, R 統計ソフトウェアを用いて, 群間の比較には Kruskal-Wallis 検定を用い, また, サブグループの比較には Post-hoc Tukey 検定を使用して比較検討した。

4. 研究成果

全症例中, 遺伝子型と表現型の一致により心筋症やチャネル異常症と診断できた症例は 7 例 (11%), これまで文献情報がないが本研究により疾患との関連性が示され新規研究報告に用いた症例は 15 例 (23%), 残り 43 例 (66%) については未診断であった。以下に, 研究論文報告を示す。

(1) 20 代前半男性の突然死

心電図の過渡的な解析により, 経時的に QRS 間隔の延長が明らかになった。剖検では軽度の僧帽弁逸脱症と左心室の過剰な肉柱形成が認められた。病理組織学的検査では, 左心室に非常に少量ではあるが重要な最小限の心筋壊死巣があり, 左脚の伝導線維が著しく減少していた。これらの所見は, 心室内伝導遅延と関連している可能性がある。全エクソームシーケンシングを用いた遺伝子検査では, Emery-Dreifuss 筋ジストロフィー関連遺伝子変異である SYNE2_p. A6155V を含む 4 つの稀な病原性の可能性がある変異が検出された。この変異は, ほとんどの in silico 予測ツールで病原性と評価されている。他に検出された病原性の可能性がある変異は, PLEC_p. P973L, TTN_p. I22171T, p. A12216T でした。これらの変異は, ACMG ガイドラインでは病的意義不明 (VUS)。しかし, 進行性の伝導遅延は Emery-Dreifuss 筋ジストロフィー関連遺伝子変異による心筋細胞の脆弱性に関連している可能性があるかと推察された。進行性の伝導遅延を示す若年者は, 他の臨床症状がなく, 構造的な疾患が軽度または存在しない場合でも, 医学的な精査および遺伝子検査の必要性が示唆された。

(2) 40 代後半男性の突然死

死亡の 2 年前に僧帽弁逆流症と診断された。解剖所見では, 左室肥大と両側の余剰弁尖による billowing や弁の肥厚など, Barlow 病に一致する所見があった。組織学的には, 僧帽弁の 3 層構造の破壊と左室壁の進行性間質性線維症が明らかとなった。また, 左右枝の分岐点において, 特に進行した伝導線維の顕著な減少が見られ, 特発性完全房室ブロックの症例で見られるものと一致した。全エクソーム解析を用いた遺伝子解析では, いくつかの VUS が見つかったが, 既知の Barlow 病に関連する遺伝子変異は認めなかった。Barlow 病症例では, 伝導線維の顕著な減少が突然死のサブタイプとなり得る。心臓の一部に不整脈原性の基質が重なることで, 無症状の Barlow 病症例の突然死リスクが増加する可能性がある。

(3) 加齢に伴う心臓伝導系の病的変性によるものと考えられている特発性徐脈性不整脈に対する包括的な遺伝子研究

10 例の特発性徐脈症例 (男性 6 名, 女性 4 名) を対象に, 全エクソーム解析を用いた遺伝子解析を行った。また, 性別, 年齢, 合併症が一致する対照例として, 心臓伝導系 (CCS) の形態計測解析を行った。その結果, 洞不全 (SND) および完全房室ブロック (CAVB) の症例それぞれで, 洞結節細胞および末梢房室伝導系の高度な減少が見られた。しかし, CAVB 症例においては, 房室結節やヒス束の近位部位での伝導組織の減少は有意ではなかった。また, 3 例の CAVB および 2 例の SND 症例で, 合計 13 のヘテロ接合型の潜在的な変異が見つかった。このうち 4 つは既知の進行性心臓伝導疾患関連遺伝子 (GATA4 および RYR2) のミスセンス変異であった。残りの 9 つの変異のうち, 5 つは高度な病原性を有する機能喪失変異であった。加齢変性に加えて, 「稀な効果量の小さい変異」に関連する CCS の脆弱性が, 特発性徐脈の CCS の変性に寄与している可能性がある。

(4) 突然死した若年者 DM1 (筋ジストロフィー 1 型) 3 症例の突然死の病理学的および遺伝学的検討

生前の心電図において, 症例 1 に軽度 QRS 間隔の延長があった。病理学的には, 症例の心臓組

織に異常が見られた。症例 1 では房室伝導系の重度の線維症、症例 2 では右室の重度の脂肪浸潤が観察され、いくつかの微小な壊死/炎症巣も見られた。一方、症例 3 には有意な病理学的所見はなかった。さらに、遺伝子解析では、症例 1 に CORIN_p. W813 および MYH2_p. R793、症例 2 に KCNH2_p. V794D および PLEC_p. A4147T、症例 3 に SCN5A_p. E428K および SCN3B_p. V145L が病原性変異として確認された。これらの結果は、DM1 症例における心臓関連合併症のリスク評価に包括的な検査が必要であることを示唆した。この研究は、若年成人の DM1 症例における心臓形態の多様性を明らかにし、心臓および骨格筋の関与の徴候が軽度であっても、DMPK 以外の遺伝子因子の相乗効果が突然死リスクを高める可能性を示し、CTG リピートの評価以外にも包括的な遺伝子解析が、DM1 症例の突然死リスクの推定に有用である可能性を示した。

成果の総論として、突然死の死因究明において、詳細な病理組織学的検索と遺伝子解析の併用が重要であることを示した。次世代シーケンスを用いた網羅的な遺伝子解析により、従来の方法では検出が難しかった稀な変異体の特定が可能となり、新たな病態の解明に貢献することができた。

エクソーム解析の結果、症例の遺伝的背景は多様であったが、絞り込み条件を緩和し、複数のオミクスデータを活用した病態関連経路を考慮することで、病原性可能性変異体を抽出した。候補である遺伝子変異に基づく組織レベルの病理所見の再評価を行うことで、これまで見過ごされていた遺伝子型と表現型を特定することができた。このようにして作成したプロトコールを運用した結果、サンプル収集からデータ解析までの症例数が蓄積できた。

未診断の症例については、半数が現在検討中であり、今後、学会発表や論文を予定している。

今後の課題としては、症例数が少ないため大規模な検証が難しいこと、エクソーム解析では検出されない構造変異や複雑なリピート領域の解析が行われなかったこと、新たに特定された遺伝子変異の病原性評価が難しいことなどが考えられる。今後は、症例の蓄積を行うこと、全ゲノム解析やロングリード解析など高度なシーケンス技術を用いること、さらにオミクスデータを活用することなどの対策を進め、診断精度の向上を目指す。

今回の研究で得られた成果は、突然死の原因解明における遺伝子解析の重要性を再確認するとともに、新たな病態の発見と診断プロトコールの確立に向けた基盤を築くものであった。今後も、さらなる症例の蓄積と解析を進め、より正確な診断と予防策の確立を目指していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Hata Yukiko, Ichimata Shojiro, Hirono Keiichi, Yamaguchi Yoshiaki, Oku Yuko, Ichida Fukiko, Nishida Naoki	4. 巻 87
2. 論文標題 Pathological and Comprehensive Genetic Investigation of Autopsy Cases of Idiopathic Bradyarrhythmia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 111 ~ 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-22-0397	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 Hata Y, Ichimata S, Yoshida K, Yamaguchi Y, Hirono K, Nishida N.	4. 巻 270
2. 論文標題 Comprehensive pathological and genetic investigation of three young adult myotonic dystrophy type 1 patients with sudden unexpected death.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Neurol.	6. 最初と最後の頁 5380-5391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00415-023-11850-8.	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 Hata Yukiko, Tomita Naoko, Shibata Atsushi, Yokoyama Shigeki, Fukahara Kazuaki, Nishida Naoki	4. 巻 61
2. 論文標題 An autopsy case of sudden unexpected death with Barlow's disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cardiovascular Pathology	6. 最初と最後の頁 107462 ~ 107462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carpath.2022.107462	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 Hata Yukiko, Hachiwaka Ryotaro, Ichimata Shojiro, Yamaguchi Yoshiaki, Nishida Naoki	4. 巻 240
2. 論文標題 An autopsy case of sudden unexpected death of a young adult with progressive intraventricular conduction delay	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathology - Research and Practice	6. 最初と最後の頁 154226 ~ 154226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.prp.2022.154226	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8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 畑由紀子, 一萬田正二郎, 西田尚樹.
2. 発表標題 筋強直性筋ジストロフィー1型突然死剖検例の病理および遺伝子学的背景.
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 畑由紀子, 一萬田正二郎, 西田尚樹.
2. 発表標題 進行性心室内伝導遅延を呈した若年者突然死の1剖検例.
3. 学会等名 第107次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hata Y, Ichimata S, Hirono K, Yamaguchi Y, Oku Y, Ichida F, Nishida N.
2. 発表標題 Pathological and comprehensive genetic investigation of autopsy cases of idiopathic bradyarrhythmia.
3. 学会等名 第88回日本循環器学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 畑由紀子, 一萬田正二郎, 西田尚樹
2. 発表標題 Barlow症候群による心臓突然死の一部検例
3. 学会等名 第44回 第69回 日本法医学会学術中部近畿地方集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 畑由紀子, 一萬田正二郎, 廣野恵一, 山口由明, 市田路子, 西田尚樹
2. 発表標題 Pathological and comprehensive genetic investigation of autopsy cases of idiopathic bradyarrhythmia
3. 学会等名 第68回日本不整脈心電学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西田尚樹, 畑由紀子
2. 発表標題 てんかんの病理と遺伝子検索
3. 学会等名 第5回法医分子病理研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 畑由紀子, 一萬田正二郎, 西田尚樹.
2. 発表標題 Pathological and Comprehensive Genetic Investigation for Autopsy Cases with Advanced Bradyarrhythmia.
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八若遼太郎, 畑由紀子, 一萬田正二郎, 西田尚樹.
2. 発表標題 Emery-Dreifuss型筋ジストロフィー による心臓突然死と考えられた一剖検例.
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

富山大学大学院医学薬学研究部（医学系）法医学講座_研究業績
<http://www.med.u-toyama.ac.jp/legal/publications.html>

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	西田 尚樹 (Nishida Naoki) (10315088)	富山大学・学術研究部医学系・教授 (13201)	
研究分担者	一萬田 正二郎 (Ichimata Shojiro) (60849355)	富山大学・学術研究部医学系・助教 (13201)	
研究分担者	廣野 恵一 (Hirono Keiichi) (80456384)	富山大学・学術研究部医学系・講師 (13201)	

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
---------	---------