

## 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 5 月 24 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790605

研究課題名（和文）心臓突然死の新たな診断アプローチ：致死性不整脈原因遺伝子変異の迅速検出法の検討

研究課題名（英文）An approach to the diagnosis of sudden cardiac death: Investigation of a detection method for mutations in genes associated with inherited lethal cardiac arrhythmias

## 研究代表者

松末 綾 (MATSUSUE AYA)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：70309920

## 研究成果の概要（和文）：

器質的変化を認めない心臓突然死解剖例において、遺伝性致死性不整脈の原因遺伝子の変異の有無を探索したところ、1つの変異が認められ、不整脈との関連が示唆された。また、病理学的検索の結果、不整脈源性右室心筋症で死亡したと考えられる症例について、原因遺伝子の変異を探索したところ、いくつかの変異が認められた。原因遺伝子変異の探索は、法医解剖において、心臓突然死の診断を科学的に補助すると考えられた。

## 研究成果の概要（英文）：

In forensic autopsy cases suspected of sudden cardiac death, where autopsy findings and pathological examination revealed no signs of fatal disease, we searched for mutations in genes associated with inherited lethal cardiac arrhythmias. One mutation was found and it was suggested that this mutation was associated with sudden cardiac death. In forensic autopsy cases suspected of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC), we searched for mutations in genes associated with ARVC and some mutations were found. Genetic analysis is scientifically helpful in the diagnosis of sudden cardiac death in forensic autopsy cases.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：法医学

## 1. 研究開始当初の背景

法医鑑定実務（剖検診断）において、死因となりうる疾病、病態を解明できず、心臓突然死としか考えられない症例は多く経験さ

れる。特に致死性不整脈で死亡した場合、病理組織学的に器質的変化を認めない為、死因の判定に苦慮する場合が多い。

近年、疾病と遺伝子変異との関連が研究され、数々の原因遺伝子が明らかにされている。

その中で、遺伝性致死性不整脈の原因遺伝子も明らかにされてきており、その変異により致死性不整脈を発症することが示唆され、臨床において患者を対象に特定の遺伝子変異が調べられている (Makita et al *Circulation* 106 1269-74 2002)。しかし、原因遺伝子は数多く存在しており、それらを全て網羅しているとは言えない。また、法医解剖例においては、遺伝性致死性不整脈の遺伝子変異を調べているケースはほとんどない。

私は、これまでに、様々な疾病や病態を引き起こす原因遺伝子の変異に関して、疫学、法医実務的観点から研究を行ってきた (*Clin Biochem.* 42(6) 477-83 2009, *J Forensic Leg Med.* 17 (1): 46-9 2010)。その過程で、薬毒物により横紋筋融解症を発症したと考えられる解剖例から、致死性不整脈、心不全との関連が示唆される *ryanodine receptor 2 (RYR2)* のアイソフォームである *ryanodine receptor 1 (RYR1)* 遺伝子の変異を同定した [平成 20 年度科学研究費補助金 若手研究 (B)]。

以上の学術的背景をもとに、致死性不整脈の原因遺伝子の変異を調べることににより、心臓突然死の診断アプローチをするという本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

(1) 心臓突然死解剖例における遺伝性致死性不整脈の原因遺伝子の変異の有無の探索  
遺伝性致死性不整脈の主な原因遺伝子である、心筋イオンチャネルを含む 2 遺伝子 (*sodium channel, voltage-gated, type V, alpha subunit, SCN5A* 並びに *RYR2*) の変異の有無を探索する。器質的変化を認めない心臓突然死で死亡したと考えられる解剖例より、前記 2 遺伝子のエクソン領域の変異を特定する。

(2) 不整脈源性右室心筋症 (arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, ARVC) 例における原因遺伝子の変異の有無の探索

病理学的検索の結果、ARVC で死亡したと考えられる症例について、*Desmoplakin (DSP)* 遺伝子および *Transforming growth factor-β3 (TGF-β3)* 遺伝子の変異の有無を探索する。前記 2 遺伝子のエクソン領域の変異を特定する。

## 3. 研究の方法

心臓突然死で死亡した可能性のある 8 剖検例において、*SCN5A* 遺伝子の変異を探索した。福岡大学の解剖例の中から、心臓突然死で死亡したと考えられる 8 剖検例について、血液から常法に従って DNA を抽出した。遺伝性致死性不整脈の原因遺伝子の一つであ

る *SCN5A* 遺伝子は 28 のエクソンからなっており、今回の解析では、*SCN5A* 遺伝子内のアミノ酸をコードしているエクソン 2 からエクソン 28 の塩基配列の解析を行った。それぞれのエクソンを増幅するようにプライマーを設計し、PCR で増幅後、増幅産物を精製し、ダイレクトシーケンス法で *SCN5A* 遺伝子の翻訳領域の変異を探索した。

また、病理学的検索の結果、ARVC で死亡したと考えられる 3 例について、血液から DNA を抽出し、*TGF-β3* 遺伝子並びに *DSP* 遺伝子の変異を検索した。*TGF-β3* 遺伝子並びに *DSP* 遺伝子の全てのエクソンについて、それぞれのエクソンを増幅するようにプライマーを設計し、PCR で増幅後、増幅産物を精製し、ダイレクトシーケンス法で変異の有無を探索した。

なお、本研究は、福岡大学医に関する倫理委員会の承認を得ている。

## 4. 研究成果

*SCN5A* 遺伝子の変異を探索した結果、心臓突然死で死亡した可能性のある 8 剖検例の中で、アミノ酸置換を伴う変異が認められたのは、1 例だけであった。その変異は、Fig.1 に示すように、*SCN5A* 遺伝子のエクソン 20 のグアニンがアデニンへ変異したヘテロ接合体変異だった。この変異により、1132 番目のアミノ酸であるアルギニンがグルタミンに置換していた (R1193Q)。それ以外の 7 症例には、アミノ酸置換を伴う変異は認められなかった。

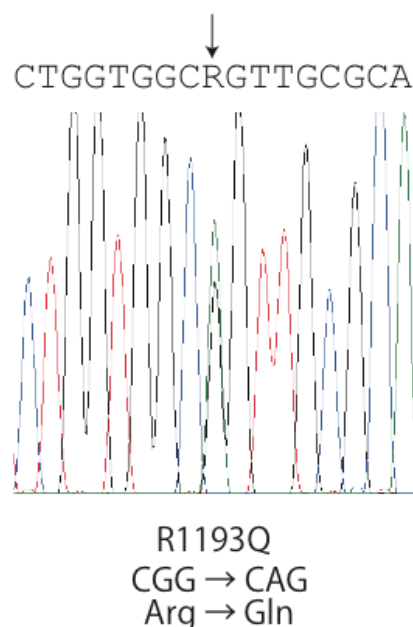


Fig.1 *SCN5A* 遺伝子に認められた変異

*SCN5A* 遺伝子に変異が認められた症例は、

30代男性。男性は、覚醒剤取締法違反で拘置所に入所した5ヶ月後の夜間、拘置所内で、痙攣したまま、いびきをかいているのを発見された。その後、心肺停止の状態での病院に搬入され、心肺蘇生を行ったが、回復することなく、死亡確認された。解剖の結果、本屍の心臓は、重量が約360g。左心室が軽度拡張し、所々に脂肪浸潤、線維化がみられた。その他は特に著変を認めなかった。脳重量は約1220g。本屍は18年前、交通事故後、水頭症となり、脳室—腹腔シャント形成術を受けていた。本屍の脳には、脳室—腹腔ドレナージが挿入されているのが確認されたが、チューブの詰まり等の機能を著しく低下させるような異常は認められなかった。また、脳に器質的な異常は認められなかった。その他、本屍には重篤な損傷は認められず、その他の疾病や薬毒物等の明らかに致死的原因も認められなかった。

SCN5Aタンパクは、構造的に、大きく4つのドメインからなり、それぞれのドメインは6つのセグメント(S1~S6)で構成されている。今回、この症例に認められたR1193Qは、SCN5Aタンパクの、ドメイン2とドメイン3をつなぐ細胞内ループの、ドメイン3の近くに存在する(Fig.2)。この変異は、過去に、Brugada症候群とQT延長症候群の患者に認められており、*in vitro*の実験系でナトリウムチャネルの不活性化を促進することが報告されている。以上の結果から、この男性は、SCN5A遺伝子の変異R1193Qにより、不整脈を起こし、突然死した可能性が考えられた。

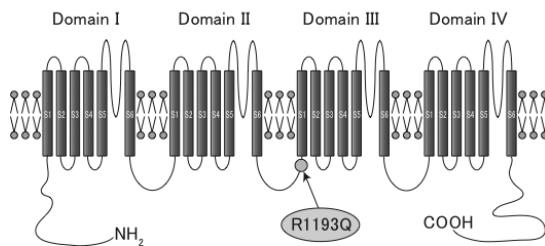


Fig.2 SCN5Aタンパク構造およびR1193Qの位置

また、上記の心臓突然死で死亡した可能性のある8剖検例について、血液からDNAを抽出し、遺伝性致死性不整脈の原因遺伝子の一つであるRYY2遺伝子の変異を検索した。RYY2遺伝子の高多型領域とされる、エクソン8-15、44-47、49、83-105の計36エクソン

ンについて、ダイレクトシーケンス法で変異の有無を探索したが、これらの領域に、アミノ酸置換を伴う変異は認められなかった。

また、病理学的検索の結果、ARVCで死亡したと考えられる3剖検例について、血液からDNAを抽出し、TGF-β3遺伝子並びにDSP遺伝子の変異を検索した。

TGF-β3遺伝子の全てのエクソンについて、ダイレクトシーケンス法で変異の有無を探索したが、アミノ酸置換を伴う変異は認められなかった。

DSP遺伝子の全てのエクソンについて、ダイレクトシーケンス法で変異の有無を探索したところ、1例において、エクソン12の494番目のアミノ酸TyrがPheへ置換したホモ接合体変異(Y494F: Fig.3-1)、エクソン23の1512番目のアミノ酸TyrがCysに置換したヘテロ接合体変異(Y1512C: Fig.3-2)、エクソン24の2869番目のアミノ酸IleがValに置換したヘテロ接合体変異(I2869V: Fig.3-3)が認められた。

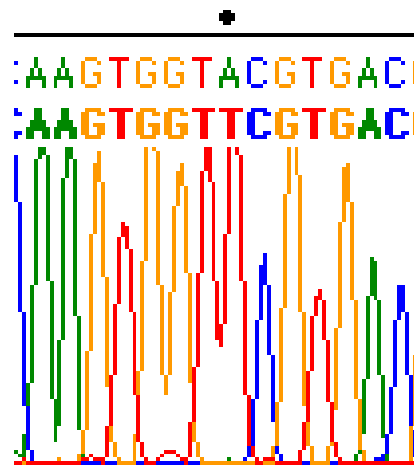


Fig.3-1 DSP遺伝子に認められた変異(Y494F)

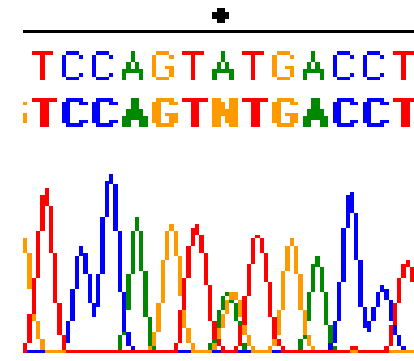


Fig.3-2 DSP遺伝子に認められた変異(Y1512C)

Fig.3-3 DSP 遺伝子に認められた変異 (I2869V)

また、1例において、Y1512Cのヘテロ接合体変異が認められた。残る1例には、アミノ酸置換を伴う変異は認められなかった。

Y494Fの日本人の健常人における頻度を調べたところ、変異 allele の出現頻度は16.6%であった。よって、Y494Fは日本人に多く認められる polymorphism で、ARVCには関係ない可能性があると考えられた。その他の変異の ARVC への影響については現在考察中である。

今回の研究により、心臓突然死で死亡した可能性のある法医解剖例について、原因遺伝子の変異の有無を調べることで、死因の診断を科学的に補助することが可能であると考えられた。

#### 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1件)

Aya Matsusue, Masayuki Kashiwagi, Kenji Hara, Brian Waters, Tomoko Sugimura, Shin-ichi Kubo. An autopsy case of sudden unexpected nocturnal death syndrome with R1193Q polymorphism in the SCN5A gene. *Legal Medicine*, 査読有, in press.

[学会発表] (計1件)

松末 綾 心臓突然死剖検例における *SCN5A* 遺伝子の変異探索. 第61回日本法医学学会学術九州地方集会, 2011年10月7日長崎.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松末 綾 (MATSUSUE AYA)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号: 70309920

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: