

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23790873  
 研究課題名（和文） 次世代シーケンサーを用いた家族性心房細動の原因遺伝子検索  
 研究課題名（英文） Genetic analysis of familial atrial fibrillation using next generation sequencer  
 研究代表者  
 相澤 義泰 (AIZAWA YOSHIYASU )  
 慶應義塾大学・医学部・助教  
 研究者番号：20528145

研究成果の概要（和文）：家族性心房細動症例に対し、書面にて説明し同意を得た上で、遺伝子解析目的の末梢血採取を行った。これまでに収集したサンプルは 11 家系、内訳は家族性 7 例、若年性 4 例であった。これらの家系に対し PCR、DNA シーケンスにて塩基配列を解析した。候補遺伝子アプローチにより、*KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNJ2*, *CACNA1C* 遺伝子の解析を行なったが、これまでに家族性心房細動において報告のある遺伝子において変異は同定されなかった。

そこで次世代シーケンサーを用いて、原因遺伝子の検索を行なった。対象疾患は他に原因遺伝子の同定が比較的容易と考えられる他の心臓イオンチャネル病（ブルガダ症候群、QT 延長症候群）も含めた。各症例より抽出したゲノム DNA を超音波破碎により断片化し、液相ハイブリダイゼーションにて標的エクソン配列を濃縮した。標的エクソンは循環器疾患に関連する原因遺伝子を網羅するものとした。得られた混合試料を Illumina 社シーケンサーにより、標的エクソン配列の解析を行った。

今後報告済みの SNP を除去したのち、家族内の罹患患者と非罹患患者の標的エクソン解析結果を比較検討することにより、原因遺伝子の候補を絞り込む予定である。

また、新規原因遺伝子の同定が期待された場合は、疾患特異的 iPS 細胞による機能解析を行う予定である。

研究成果の概要（英文）：We collected blood samples of the patients with familial atrial fibrillation after obtained written informed consent. So far, 11 pedigrees including 7 familial and 4 younger cases were included. The DNAs of these patients were sequenced for *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNJ2*, and the *CACNA1C* genes. However no mutation was detected.

Therefore we searched responsible gene for these patients using next generation sequencer. Targeted genes included disease causing genes of various cardiac ion channel diseases.

We will further exclude SNPs by investigating familial member without disease phenotype.

We will perform functional analysis using disease specific iPS cells in the future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器科学

キーワード：遺伝性不整脈、イオンチャンネル、心房細動、変異、パッチクランプ法

### 1. 研究開始当初の背景

心房細動(AF)は臨床において最も良く遭遇する不整脈であるが、一部に遺伝性疾患が含まれるという認識は薄かった。しかし、既に1943年に家族発生例が報告されており、フラミンガム研究では、少なくとも両親の一方にAFが確認された2243人の681人(30%)のうち、経過観察中にAFを発症したものは70人(10%)であったことが示されている。これは片親がAFに罹患した場合、子のAF発症リスクは両親にAFがない場合に比べて1.85倍に相当する。さらに過去に心筋梗塞、心不全および弁膜症などAF発生の危険因子となる病態の既往のない75歳未満を対象にすると、オッズ比は3.17と増加した。Darbarらは914人のAF患者のうちLone AFは36%であり、Lone AFの15%にAFの家族歴が存在したと報告している。1997年にBrugadaらは優性遺伝形式をとるスペインのAFの3家系を報告し、連鎖解析によりその遺伝子座を10q22-24に初めて同定した。しかしその後この遺伝子は未だ明らかになっていない。家族性AFにおいて2003年、Chenらは優性遺伝形式を示すAFの中国人の4家系を解析し、11p15.5に存在するKCNQ1に遺伝子異常(S140G)を同定した。(Science, 299:251-4.) 次いでKCNH2, KCNE2変異が報告された。

図：心房細動の原因遺伝子

Gene	Locus	Nucleotide/Amino acid Change	Reference
<b>Gene identified</b>			
KCNQ1	11p15.5	A418G/S140G	Chen et al. Science 2003
KCNE2	21q22.1	C79T/R27C	Yang et al. Am J Hum Genet 2004
KCNJ2	17q25.1-24.2	G277A/V93I	Xu et al. BBRC 2005
KCN45	12p13	G1123T/E375X	Olson et al. Hum Mol Genet 2004
GJA5	1q21.1	G113A/G38D	Gottlieb et al. NEJM 2004
		C262T/P88S	"
		G286T/A96S	"
		A487G/M163V	"
<b>Locus identified</b>			
	10q22-24	Type of Inheritance	Brugada et al. NEJM 1997
	6q14-16	AD	Ellsner et al. Circulation 2001
	5p13	AR	Oberti et al. Circulation 2004

また、AFの発症につながる遺伝多型もいくつか報告されている。

図：心房細動に関連する遺伝子多型

Gene	Nucleotide change	Reference
<b>Polymorphism</b>		
KCNK1	38G	Ravn et al. Am Heart J 2002
KCNK5	97T	Lai et al. Am J Cardiol 2005
Cx40	44(G to A)	Figueroa et al. Circ Res 2004
	-71(A to G)	"
ACE	M235T	Tsai et al. Circulation 2004
	G-6A	"
	G-217A	"

この様に極めてありふれた心房細動の発生機序に、心筋イオンチャンネルの遺伝子異常が関与し、発生と維持および心室筋ではQT短縮などに関与する可能性がある。しかし、心房細動に関連する遺伝子異常はなお未知の部分が多く、その病態の解明が急務である。

### 2. 研究の目的

我々の研究目的は従来の候補遺伝子アプローチにより原因遺伝子が同定されない若年性・家族性心房細動症例に対し、最近利用可能となった次世代シーケンサーを用いて新規の変異遺伝子を同定しその機能解析を行うことである。

### 3. 研究の方法

若年発症例や家族発症例の心房細動症例において、次世代シーケンサーよりこれまでに報告の無い遺伝子異常を明らかにする。明らかになった遺伝子異常に対して、電気生理学的に機能解析を行う。必要に応じて共焦点レーザー顕微鏡、動物実験などを行う。得られた実験データから心房細動の発生機序と病態を解明し、臨床応用の可能性およびテーラーメイド医療の可能性を探索する。

### 4. 研究成果

家族性心房細動症例に対し、書面にて説明し同意を得た上で、遺伝子解析目的の末梢血採取を行った。これまでに収集したサンプルは11家系、内訳は家族性7例、若年性4例であった。これらの家系に対しPCR、DNAシーケンスにて塩基配列を解析した。候補遺伝子アプローチにより、KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNE2, KCNJ2, CACNA1C遺伝子の解析を行なったが、これまでに家族性心房細動において報告のある遺伝子において変異

は同定されなかった。

そこで次世代シーケンサーを用いて、原因遺伝子の検索を行なった。対象疾患は他に原因遺伝子の同定が比較的容易と考えられる他の心臓イオンチャネル病（ブルガダ症候群、QT延長症候群）も含めた。各症例より抽出したゲノムDNAを超音波破碎により断片化し、液相ハイブリダイゼーションにて標的エクソン配列を濃縮した。標的エクソンは循環器疾患に関連する原因遺伝子を網羅するものとした。得られた混合試料を Illumina 社シーケンサーにより、標的エクソン配列の解析を行った。

今後報告済みの SNP を除去したのち、家族内の罹患患者と非罹患患者の標的エクソン解析結果を比較検討することにより、原因遺伝子の候補を絞り込む予定である。

また、新規原因遺伝子の同定が期待された場合は、疾患特異的 iPS 細胞による機能解析を行う予定である。

## 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 16 件)

1. Aizawa Y, Takatsuki S, Inagawa K, Katsumata Y, Nishiyama T, Kimura T, Nishiyama N, Sato Y, Fukumoto K, Tanimoto Y, Tanimoto K, Fukuda K. Narrow QRS tachycardia : Mechanism behind changes in conduction. *Herz*. 2013 Mar 14. (印刷中、査読有)
2. Aizawa Y, Takatsuki S, Kimura T, Nishiyama N, Fukumoto K, Tanimoto Y, Tanimoto K, Miyoshi S, Suzuki M, Yokoyama Y, Chinushi M, Watanabe I, Ogawa S, Aizawa Y, Antzelevitch C, Fukuda K. Ventricular fibrillation associated with complete right bundle branch block. *Heart Rhythm*. 2013 Mar 14. (印刷中、査読有)
3. Takatsuki S, Fukumoto K, Igawa O, Kimura T, Nishiyama N, Aizawa Y, Tanimoto Y, Tanimoto K, Miyoshi S, Fukuda K. Ridge-Related Reentry: A Variant of Perimitral Atrial Tachycardia. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2013 Feb 22. (印刷中、査読有)
4. Kimura T, Takatsuki S, Inagawa K, Katsumata Y, Nishiyama T, Nishiyama N, Fukumoto K, Aizawa Y, Tanimoto Y, Tanimoto K, Jinzaki M, Fukuda K. Anatomical characteristics of the left atrial appendage in cardiogenic stroke with low CHADS2 scores. *Heart Rhythm*. 2013 Jun;10(6):921-925. (査読有)
5. Aizawa Y, Takatsuki S, Kimura T,

Nishiyama N, Fukumoto K, Tanimoto Y, Tanimoto K, Fukuda Y, Miyoshi S, Fukuda K. Successful radiofrequency catheter ablation of atrioventricular nodal reentrant tachycardia in a patient with dextrocardia and situs inversus. *Herz*. 2013 Feb;38(1):102-4. (査読有)

6. Fukumoto K, Takatsuki S, Jinzaki M, Yamada M, Tanimoto K, Nishiyama N, Aizawa Y, Hagiwara Y, Fukuda Y, Kimura T, Miyoshi S, Kuribayashi S, Fukuda K. Three-dimensional imaging and mapping of the right and left phrenic nerves: relevance to interventional cardiovascular therapy. *Europace*. 2013 Jan 15. (印刷中、査読有)

7. Nishiyama N, Sato T, Aizawa Y, Nakagawa S, Kanki H. Extreme QT prolongation during therapeutic hypothermia after cardiac arrest due to long QT syndrome. *Am J Emerg Med*. 2012 May;30(4):638. e5-8.

8. Otsuka H, Arimura T, Abe T, Kawai H, Aizawa Y, Kubo T, Kitaoka H, Nakamura H, Nakamura K, Okamoto H, Ichida F, Ayusawa M, Nunoda S, Isobe M, Matsuzaki M, Doi YL, Fukuda K, Sasaoka T, Izumi T, Ashizawa N, Kimura A. Prevalence and distribution of sarcomeric gene mutations in Japanese patients with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ J*. 2012;76(2):453-61. (査読有)

9. Aizawa Y, Negishi M, Fukuda Y, Takatsuki S. Trans-telephonic ICD alert due to recommended replacement time notification: What is the problem? *Int J Cardiol*. 2012 Aug 9;159(1):e18-9. (査読有)

10. Aizawa Y, Jastrzebski M, Ozawa T, Kawecka-Jaszcz K, Kukla P, Mitsuma W, Chinushi M, Ida T, Aizawa Y, Ojima K, Tagawa M, Fujita S, Okabe M, Tsuchida K, Miyakita Y, Shimizu H, Ito S, Imaizumi T, Toba K. Characteristics of electrocardiographic repolarization in acute myocardial infarction complicated by ventricular fibrillation. *J Electrocardiol*. 2012 May-Jun;45(3):252-9. (査読有)

11. Aizawa Y, Sato A, Watanabe H, Chinushi M, Furushima H, Horie M, Kaneko Y, Imaizumi T, Okubo K, Watanabe I, Shinozaki T, Aizawa Y, Fukuda K, Joo K, Haissaguerre M. Dynamicity of the J-wave in idiopathic ventricular fibrillation with a special reference to pause-dependent augmentation of the J-wave. *J Am Coll Cardiol*. 2012 May 29;59(22):1948-53. (査読有)

12. Egashira T, Yuasa S, Suzuki T, Aizawa Y, Yamakawa H, Matsuhashi T, Ohno Y, Tohyama S, Okata S, Seki T, Kuroda Y, Yae K, Hashimoto H, Tanaka T, Hattori F, Sato T, Miyoshi S, Takatsuki S, Murata M, Kurokawa J, Furukawa T, Makita N, Aiba T, Shimizu W, Horie M, Kamiya K, Kodama I, Ogawa S, Fukuda K. Disease characterization using LQTS-specific induced pluripotent stem cells. *Cardiovasc Res.* 2012 Sep 1;95(4):419-29. (査読有)
13. Kimura T, Takatsuki S, Fukumoto K, Nishiyama N, Sato Y, Aizawa Y, Fukuda Y, Sato T, Miyoshi S, Fukuda K. Electrical isolation of the superior vena cava using upstream phrenic pacing to avoid phrenic nerve injury. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2012 Sep;35(9):1053-60. (査読有)
14. Nishiyama N, Takatsuki S, Kimura T, Aizawa Y, Fukumoto K, Hagiwara Y, Tanimoto K, Fukuda K. Implantation of the right ventricular lead of an implantable cardioverter-defibrillator complicated by apical myocardial infarction. *Circulation.* 2012 Sep 4;126(10):1314-5. (査読有)
15. Aizawa Y Tanaka T, Fukuda K, Funazaki T. Notch on the T wave. *Intern Med.* 2011;50(12):1353. (査読有)
16. Aizawa Y, Matsuhashi T, Sato T, Takatsuki S, Fukuda K. A danger of induction of Brugada syndrome during pill-in-the-pocket therapy for paroxysmal atrial fibrillation. *Drug Healthc Patient Saf.* 2010;2:139-40. (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

1. Yoshiyasu Aizawa, Seiji Takatsuki, Kohei Inagawa, Yoshinori Katsumata, Takahiko Nishiyama, Takehiro Kimura, Nobuhiro Nishiyama, Kotaro Fukumoto, Yoko Tanimoto, Kojiro Tanimoto, Shun Kohsaka, Mitsushige Murata, Shunichiro Miyoshi, Hideo Mitamura, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. Clinical and Electrocardiographic Characteristics of Right Bundle Branch Block in Patients with Brugada Syndrome. 第 77 回日本循環器学会学術集会. 2013 年 03 月 15-17 日. 神奈川県横浜市.
2. 相澤義泰, 高月誠司, 根岸壮親, 大石愛光, 富永浩史, 稲川浩平, 勝俣良紀, 西山崇比古, 木村雄弘, 西山信大, 福本耕太郎, 谷本陽子, 谷本耕司郎, 福田恵一. デバイスで検出された心房細動の患者背景と臨床的特徴の検討. 第 5 回植込みデバイス関連冬季大会. 2013 年 2 月 22 日~24 日. 東京都千代田

区.

3. 相澤義泰, 檜村晋, 稲川浩平, 勝俣良紀, 西山崇比古, 木村雄弘, 西山信大, 福本耕太郎, 谷本陽子, 谷本耕司郎, 高月誠司, 福田恵一. Brugada 症候群および特発性心室細動患者に対するベプリジルの不整脈イベント抑制効果に関する検討. 第 7 回 Arrhythmia Frontier (AF). 2012 年 12 月 1 日, 東京.
4. 稲川浩平, 相澤義泰, 高月誠司, 勝俣良紀, 西山崇比古, 木村雄弘, 西山信大, 福本耕太郎, 谷本陽子, 谷本耕司郎, 湯浅慎介, 西森健雄, 稲垣雅行, 有村卓朗, 木村彰方, 三田村秀雄, 福田恵一. 家族性 WPW 症候群の 1 家系における臨床像の検討. 第 29 回日本心電学会学術集会. 2012 年 10 月 12 日.
5. Yoshiyasu Aizawa, Seiji Takatsuki, Kohei Inagawa, Yoshinori Katsumata, Takahiko Nishiyama, Takehiro Kimura, Nobuhiro Nishiyama, Kotaro Fukumoto, Yoko Tanimoto, Kojiro Tanimoto, Toshiaki Sato, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. Diagnostic Value of Portable Electrocardiogram (Cardiophone) in Patients Complaining of Palpitations. APHRS, 2012 年 10 月 3-6 日.
6. 相澤義泰, 高月誠司, 木村雄弘, 西山信大, 福本耕太郎, 谷本陽子, 谷本耕司郎, 香坂俊, 福田有希子, 村田光繁, 三好俊一郎, 佐藤俊明, 岩永史郎, 小川聡, 福田恵一. 動悸精査における携帯型心電計 (カルジオホン) の不整脈診断能力に関する検討. 第 60 回日本心臓病学会学術集会. 2012 年 9 月 16 日.
7. 相澤義泰, 高月誠司, 木村雄弘, 西山信大, 福本耕太郎, 谷本陽子, 谷本耕司郎, 三好俊一郎, 鈴木誠, 横山泰廣, 池主雅臣, 相澤義房, 福田恵一. 完全右脚ブロックを呈する特発性心室細動症例の臨床的および心電図学的特徴の検討. 第 27 回日本不整脈学会学術集会. 2012 年 7 月 6 日(金). 神奈川県横浜市.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他] 該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

相澤 義泰 (AIZAWA YOSHIYASU)  
 慶應義塾大学・医学部・助教  
 研究者番号: 20528145