

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790643

研究課題名(和文) 心臓性突然死における心臓イオンチャネル遺伝子解析

研究課題名(英文) Mutational analysis of cardiac ion channel detected in sudden cardiac death

研究代表者

村上 千香子 (Murakami, Chikako)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：30433717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円、(間接経費) 600,000円

研究成果の概要(和文)：法医学で扱う突然死症例のうち遺伝性致死性不整脈などの機能的な死亡では解剖において形態学的所見は乏しく、診断に苦慮する事例がある。遺伝性不整脈の病態を解明するためには家系・症例を多数集積することが重要である。本研究では心臓イオンチャネル遺伝子の変異解析を行い、遺伝子診断の可能性についての検討を行ったところ、25か所の変異および32か所の多型が検出され、KCNQ1の5多型およびKCNH2の4多型を用いることで遺伝子診断も可能となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In most cases of sudden death, cause and manner of death can be established, with many attributable to cardiac abnormalities evident at autopsy. A significant number of sudden cardiac deaths, however, particularly in young people, remains unexplained following a comprehensive medicolegal investigation, including autopsy and laboratory tests. In this study, comprehensive screening of cardiac ion channel genes, KCNQ1 and KCNH2 were performed in sudden cardiac death. It was examined whether screening of these SNPs could provide for genetic based diagnosis of sudden cardiac death. These results suggested that 5SNPs in KCNQ1 and 4SNPs in KCNH2 were important to the genetic based diagnosis of sudden cardiac death.

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：心臓イオンチャネル遺伝子 KCNQ1 KCNH2 心臓性突然死

1. 研究開始当初の背景

社会の高齢化に伴い高齢者の突然死が増加している現状をふまえ、北里大学医学部法医学教室は形態学的研究を中心として内因性突然死の病態解明を行ってきた。突然死の中でも心臓性突然死の占める割合は約 50%と多く、その研究は予防医学的にも大きな展望が望まれている。突然死の死因、病態を解明するには解剖を積極的に行う必要があるが、異状死体の取り扱い方は全国各地で異なり、また扱いに関する法規が異なっているため十分な調査・研究ができないのが現状である。

従来、病気は病態を手がかりとして診断されていたが、遺伝子操作の技法の進歩によって、遺伝子異常により生じる循環器疾患も複数見つかってきている。遺伝性致死性不整脈は若年者に突然死を惹起する予後不良の疾患であり、中でも先天性 QT 延長症候群(LQTS)は心筋活動電位の形状や伝搬に異常をきたし致死性不整脈として研究が進んでおり、現在までに 12 個の原因遺伝子が同定されている。しかし、それ以外においては依然不明な点が多く、分子病態の解明が待たれるところである。

2. 研究の目的

遺伝性致死性不整脈は症例数が少なく、一般に大家系も少ないため、連鎖解析による原因遺伝子の特定は困難である。遺伝性不整脈の病態を解明するためには家系・症例を多数集積することが重要である。我々はこれまで心臓性突然死症例においてご家族の同意のもと、原因遺伝子の検索に取り組んで研究を行ってきた。本研究では心臓イオンチャネル遺伝子の変異解析を行い、心臓性突然死の実態を解明する。

3. 研究の方法

当教室において解剖された心臓性突然死症例について KCNQ1 遺伝子、HERG 遺伝子のダイレクトシーケンス反応を行い、遺伝子変異解析を行うとともに遺伝子解析による確定診断の可能性について検討を行う。資料は当教室にて検案・解剖された心臓性突然死症例を対象とした。内訳は急性心機能不全症例 23 例、心肥大症例 27 例、肥大型心筋症 (HCM) 19 例、拡張型心筋症 (DCM) 22 例、不整脈原性右室心筋症 (ARVC) 3 例である。

4. 研究成果

(1) KCNQ1

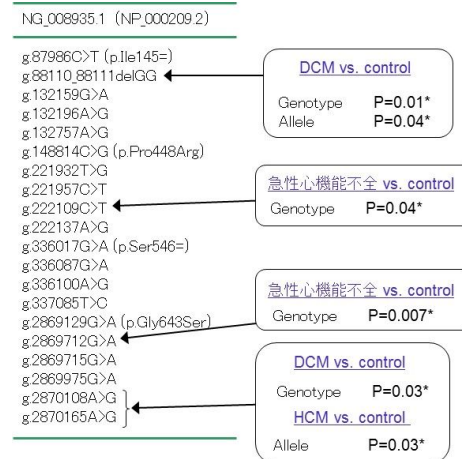
変異解析の結果、各症例のみに検出された変異は 14 か所、多型は 20 か所であった。今回新たに検出された変異は急性心機能不全で 1 か所、心肥大症例で 3 か所、HCM 症例で 1 か所であった。急性心機能不全症例で検出された g.132056A>G 変異は p.Leu239 のサイレント変異であり、p.Leu239 はカリウムチャネルの細胞膜貫通領域である S4 に位置している。

S4 は電位センサーとして機能するとされており、今回検出された p.Leu239=はサイレント変異であるが、サイレント変異はアミノ酸変異を伴わないものの疾患に影響を及ぼすという報告例もあることから、チャネル機能に関与することにより致死性不整脈を引き起した可能性も考えられた。

	NG_008935.1	NP_000209.2	症例数
急性心機能不全	<input checked="" type="checkbox"/> g.132056A>G	p.Leu239=	1
	<input type="checkbox"/> g.2869063G>A	p.Gly621Ser	1
心肥大	<input checked="" type="checkbox"/> g.131210G>A		1
	<input type="checkbox"/> g.131969G>A		2
	<input type="checkbox"/> g.222098G>T		1
	<input type="checkbox"/> g.2869077C>T	p.Pro625=	2
	<input type="checkbox"/> g.2869146C>T	p.Val648=	1
	<input type="checkbox"/> g.2870070G>A		1
	<input checked="" type="checkbox"/> g.2870110A>G		1
	<input type="checkbox"/> g.2870288C>T		1
CM	<input checked="" type="checkbox"/> g.88078G>A		HCM1
	<input type="checkbox"/> g.2869188C>T	p.Tyr662=	HCM1, DOM1
	<input type="checkbox"/> g.2870208G>T		DCM1

: 今回新たに検出された変異

急性心機能不全症例で検出された g.2869063G>A は p.Gly621Ser のアミノ酸変化を伴っており Rare control としての報告はあるものの、詳細は不明である。今回急性心機能不全症例 1 例のみに検出され、同症例は他に変異が認められなかったことから p.Gly621Ser のアミノ酸変異が致死性不整脈の原因遺伝子の可能性が示唆された。検出された多型について有意差検定を行ったところ、g.88110_88111delIGG、g.222109C>T、g.2869712G>A、g.2870108A>G および g.2870165A>G で各症例と対照との間で有意差が認められた。



有意差が認められた 5 SNPs についてその組み合わせから 16 グループを作成し、対照例との間の有意差検定を行い、これら 5 SNPs を用いた遺伝子診断の可能性について検討を行ったところ、急性心機能不全症例および DCM 症例において 5 SNPs 全てに変異を持つグループに対照との間で有意差が認められた (急性心機能不全 vs. cont; P=0.002^{*}, DCM vs cont; P=0.02^{*})。以上の結果より g.222109C>T と g.2869712G>A の変異解析は急

性心機能不全の死因究明および病態解明に有用であることが認められた。

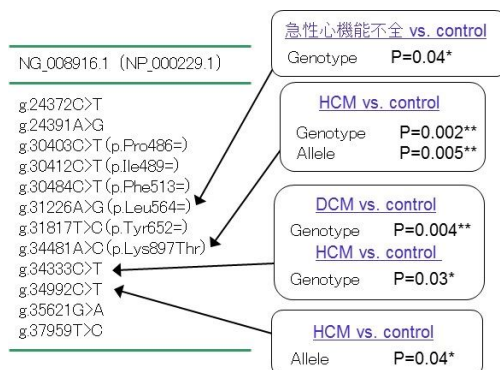
(2) KCNQ2

変異解析の結果、各症例のみに検出された変異は11か所、多型は12か所であった。今回新たに検出された変異は急性心機能不全で2か所、心肥大症例で2か所、HCM症例で1か所であった。

	NG_008916.1	NP_000229.1	症例数
急性心機能不全	g.32003C>T	p.Asp714=	1
	g.36006C>T	p.Pro1096=	1
心肥大	g.35541C>T	p.Arg1032Trp	1
	g.35692C>A		1
	g.35948C>T	p.Pro1076=	2
	g.36044T>C	p.Leu1108=	1
CM	g.30277G>A	p.Glu444=	DCM1
	g.35948C>T	p.Pro1076=	HCM1, DCM1
	g.35829C>G		DCM1
	g.37476C>G	p.Pro1132Ala	HCM1
	g.37654C>T		HCM1

□ : 今回新たに検出された変異

心肥大症例で検出された g.35541C>T 変異は p.Arg1032Trp のアミノ酸変化を伴っており、Rare control としての報告はあるものの、詳細は不明である。配列の情報から変異があった箇所の配列保存性、化学的な特徴、タンパク質構造やドメイン情報をもとにこの変異がタンパク質の機能に及ぼす影響を数値化する公知の予測ツールである PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) を用いて解析したところ、p.Arg1032Trp は病原性変異が強く示唆される probably damaging と判定された。HCM 症例で検出された g.37476C>G 変異は p.Pro1132Ala のアミノ酸変化を伴っており、今回新たに検出された変異であった。PolyPhen-2 による予測結果、有害の可能性 (possibly damaging) が示唆された。本症例は当教室で変異解析されたサルコメア構成タンパク遺伝子のうち MYL2 において p.Tyr152 にサイレント変異が認められた以外に疾患に関連した変異は見つかっていないことから、p.Pro1132Ala 変異と心筋症との関連についても検討を行う必要があると考えられた。



検出された多型について有意差検定を行ったところ、g.31226A>G、g.31817T>C、

g.34333C>T および g.34992C>T で各症例と対照との間で有意差が認められた。急性心機能不全症例においては g.31226A>G (p.Leu564=) で対照との間で有意差が認められた。KCNQ1 同様に有意差が認められた 4 SNPs についてその組み合わせから 16 グループを作成し、対照例との間の有意差検定を行い、遺伝子診断の可能性について検討を行ったところ、急性心機能不全症例においては g.34481A>C および g.34333C>T に変異を持つグループに対照との間で有意差が認められた (急性心機能不全 vs. cont; P=0.03*)。

法医学で扱う突然死症例は、主として解剖所見から死因の特定がなされているが、不整脈などの機能的な死亡では解剖において形態学的所見は乏しく、また十分な医療情報が得られないこともあり、診断に苦慮する事例がある。解剖しても明らかな病変が認められない場合には、遺伝子異常に基づく突然死も考慮しなければならない。遺伝子異常を解明することは、その疾患を治療する上で重要な第一歩であり、治療に直結せずとも、その患者の予後推定や家族へのフィードバックが可能となり、予防医学にも貢献するものと考えられる。本研究では遺伝子診断の可能性について検討を行ったが、今後さらに検出箇所および検体数を増やし有用性の検討を行っていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

- (1) 村上千香子、前田一輔、入江涉、大石桃子、佐々木千寿子、中丸尚美、中村茂基、栗原克由、心臓性突然死の遺伝子解析-KCNQ1 遺伝子の変異解析-、日本 DNA 多型、査読有、22 巻、2014、28-30.
- (2) Murakami C, Nakamaru N, Maeda K, Irie W, Oishi M, Sasaki C, Nakamaru N, Kurihara K. Analysis of gene mutations encoding sarcomeric proteins in sudden death cases caused by cardiomyopathy, Kitasato Med J. 査読有. 2014; 44: 47-55. <http://mlib.kitasato-u.ac.jp/homepage/ktms/kaiishi/pdf/KMJ44-1/KMJ44-1p047-055.pdf>
- (3) 村上千香子、前田一輔、入江涉、渡邊利真、大石桃子、佐々木千寿子、中丸尚美、古川理孝、中村茂基、栗原克由、心筋症の遺伝子解析 X -筋 LIM 蛋白遺伝子の変異解析-、日本 DNA 多型、査読有、21 巻、2013、261-4.
- (4) Maeda K, Murakami C, Irie W, Oishi M, Sasaki C, Nakamaru N, Nakamura S, Kurihara K, Mutational analysis of TTN, TCAP and TPM1 in cardiomyopathy, Forensic Science International: Genetics Supplement Series. 査読有. 2013; vol.4, e166-7. DOI:10.1016/j.fsigss.2013.10.086

- (5) Nakamura S, Murakami C, Maeda K, Irie W, Sasaki C, Watanabe T, Ohishi M, Kurihara K. Genetic analysis of g.7260-7291 region of ANKRD1 in Japanese population. Forensic Science International: Genetics Supplement Series. 査読有. 2013; vol.4, e358-9. DOI:10.1016/j.fsigs.2013.10.182

〔学会発表〕(計 11 件)

- (1) 前田一輔、村上千香子、入江涉、佐々木千寿子、中丸尚美、大石桃子、中村茂基、栗原克由。心筋症症例におけるタイチン遺伝子変異解析 第 98 次日本法医学会学術全国集会。2014 年 6 月 19 日。福岡
- (2) Maeda K, Murakami C, Irie W, Sasaki C, Nakamaru N, Oishi M, Nakamura S, Kurihara K. Genetic analysis of mtDNA mutation found in sudden death cases with cardiac hypertrophy. The 9th International Symposium on Advances in Legal Medicine. 2014 June 18. 福岡
- (3) Murakami C, Maeda K, Irie W, Oishi M, Sasaki C, Nakamaru N, Nakamaru N, Kurihara K. Analysis of KCNH2 in cardiac sudden death. The 9th International Symposium on Advances in Legal Medicine. 2014 June 17. 福岡
- (4) 村上千香子、前田一輔、入江涉、大石桃子、佐々木千寿子、中丸尚美、中村茂基、栗原克由、心臓性突然死の遺伝子解析-KCNQ1 遺伝子の変異解析-、日本 DNA 多型学会第 22 回学術集会、2013 年 11 月 22 日、宮城
- (5) Nakamura S, Murakami C, Maeda K, Irie W, Sasaki C, Watanabe T, Ohishi M, Kurihara K. Genetic analysis of g.7260-7291 region of ANKRD1 in Japanese population. 25th Congress of the International Society for Forensic Genetics. 2013 Sep 4. Australia.
- (6) Maeda K, Murakami C, Irie W, Oishi M, Sasaki C, Nakamaru N, Nakamura S, Kurihara K. Mutational analysis of TTN, TCAP and TPM1 in cardiomyopathy. 25th Congress of the International Society for Forensic Genetics. 2013 Sep 4. Australia.
- (7) 前田一輔、村上千香子、入江涉、大石桃子、佐々木千寿子、中丸尚美、中村茂基、古川理孝、栗原克由、心筋症の遺伝子解析 XIV -テロトニンおよびタイチン遺伝子の変異解析、第 97 次日本法医学会学術全国集会。2013 年 6 月 27 日、北海道
- (8) 村上千香子、前田一輔、入江涉、大石桃子、中丸尚美、佐々木千寿子、中村茂基、古川理孝、栗原克由、心筋症の遺伝子解析 XV - 症例から見る遺伝子変異 -、第 97 次日本法医学会学術全国集会、2013 年 6 月 27 日、北海道
- (9) 村上千香子、前田一輔、入江涉、渡邊利真、大石桃子、佐々木千寿子、中丸尚美、古川理孝、中村茂基、栗原克由、心筋症の遺伝子解析 -筋 LIM 蛋白遺伝子の変異解析-、日本 DNA 多型学会第 21 回学術集会、2012 年 11 月 8 日、京都
- (10) 渡邊利真、村上千香子、前田一輔、入江涉、大石桃子、佐々木千寿子、中丸尚美、中村茂基、古川理孝、栗原克由、心筋症の遺伝子解析 -心アンケリン反復蛋白遺伝子の変異解析-、第 81 回日本法医学会学術関東地方集会。2012 年 10 月 20 日、群馬
- (11) 村上千香子、中村茂基、前田一輔、入江涉、渡邊利真、中丸尚美、佐々木千寿子、古川理孝、心筋症の遺伝子解析 XI-心室型ミオシン調節軽鎖遺伝子の変異解析、第 96 次日本法医学会学術全国集会、2012 年 6 月 8 日、浜松

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 千香子 (MURAKAMI, Chikako)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：30433717