

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25年4月4日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590806

研究課題名（和文） 先天性徐脈発症機構の分子生物学的解明とこれに基づくバイオペースメーカー開発の研究

研究課題名（英文） Gene analysis for the inherited bradyarrhythmia and characterization of cardiosphere-derived cells to create biological pacemakers

研究代表者

林 研至（HAYASHI KENSHI）

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：00422642

研究成果の概要（和文）：

先天性と考えられた徐脈症例 58 例の genome DNA および臨床データを集積した。56 症例中 26 例（45%）に家族歴が認められ、ペースメーカー植込み症例は 24 例（41%）であった。遺伝子解析の結果、58 症例中 7 症例（12%）で遺伝子変異が認められ、これらの症例では QT 延長、心房細動、筋ジストロフィなどの合併が認められた。4 種類のイオンチャネル遺伝子変異に対してパッチクランプ法による電気生理学的検討を行ったところ、3 種類の変異で機能異常が認められた。マウス新生仔心筋より心筋前駆細胞の培養を行ったところ、一部の細胞で自己拍動が認められ、遅延整流 K 電流および内向き整流 K 電流の発現が認められた。

研究成果の概要（英文）：

We evaluated clinical characteristics and performed gene analysis for 58 patients with inherited bradyarrhythmia. Twenty six patients (45%) had family history of bradyarrhythmia and 24 patients (41%) underwent pacemaker implantation. Gene analysis showed mutations were found in 7 patients (12%) who were complicated by QT prolongation, atrial fibrillation, or muscular dystrophy. Cellular electrophysiological study showed functional abnormality in 3 of 4 ion channel gene mutations. We isolated cardiosphere-derived cells from the neonatal mouse heart and confirmed that some cells contracted spontaneously. Patch clamp and RT-PCR showed that at least two types of ionic currents were present in mouse cardiosphere-derived cells including a delayed rectifier K⁺ current and an inward rectifier K⁺ current.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：循環器内科

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：先天性徐脈，遺伝子解析，心筋前駆細胞，生物学的ペースメーカー

1. 研究開始当初の背景

洞不全症候群、房室ブロックといった徐脈性不整脈は、加齢による変性、心筋虚血、浸

潤性疾患などの内因性因子や、自律神経の関与、薬剤などの外因性因子によって生じる。先天的に認められる徐脈の頻度は比較的稀

であるが、その原因は多岐にわたる。主要なものとして心筋イオンチャネルの遺伝子異常が挙げられ、心臓刺激伝導障害は 40 種類以上、洞不全症候群は 20 種類以上の遺伝子異常がこれまでに同定されている。一方、徐脈性不整脈は神経筋疾患に合併して発症することも知られている。本研究では、先天性徐脈症例を包括的に集積し、発端者およびその家族に対して徐脈の原因遺伝子の網羅的遺伝子解析を行った。さらに機能解析を行い、遺伝子変異から徐脈性不整脈が発症する機構を明らかにした。

現在、徐脈性不整脈の確立した治療法は人工ペースメーカー植え込み術であるが、人工ペースメーカー移植は高価かつ手術を必要とし、生体への侵襲性が高く、電池消耗により再植え込み術が必要となる。このような背景があることなどより、近年バイオペースメーカー治療の研究が精力的に行われている。最近、心臓内に心筋への分化能を有する心筋前駆細胞が存在することが報告された。本研究では心筋前駆細胞がバイオペースメーカーとして利用可能であるか検討した。

2. 研究の目的

本研究では (1) 先天性徐脈症例における原因遺伝子の検索、(2) パッチクランプ法、シミュレーションなどによる機能解析、(3) 心筋前駆細胞によるバイオペースメーカー治療の可能性の検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 先天性徐脈症例のサンプル収集

先天性徐脈 (洞不全症候群および心臓刺激伝導障害) 症例における原因遺伝子の検索を行うため、多数の症例を集積した。インフォームドコンセントを得たのち、12 誘導心電図、遺伝子診断用採血 (EDTA 血 10ml) を収集した。

(2) 先天性徐脈の遺伝子変異検索および臨床像の把握

集積した先天性徐脈患者に対し、Hi-Res Melting 法によるスクリーニングを行い、異常パターンを認めたサンプルについては、オートシーケンサーを用いて塩基配列異常を同定した。候補遺伝子として *SCN5A*, *SCN1B*, *HCN4*, *KCNJ2*, *KCNJ3*, *KCNJ5*, *GJA5*, *EMD*, *LMNA* を対象とした。

(3) 先天性徐脈患者で同定された遺伝子変

異の機能解析

①パッチクランプ法による電気生理学的検討

イオンチャネル遺伝子に変異が認められた場合、同定された原因遺伝子変異を動物培養細胞に導入して、遺伝子変異が臨床病型を引き起こすメカニズムを解明した。CHO-K1細胞に変異cDNAとEGFP cDNAをトランスフェクションさせ、その2日後に緑色の蛍光を発している細胞を光学顕微鏡を用いて選択し、パッチクランプ法にて細胞膜上に発現したチャネルに対して、様々な矩形波を与え、電気生理学的な特徴を検討した。データの収集および解析は、pCLAMP software (version8.0) と Digi DATA 1321 A/ D converter (Axon Instruments) を用いてパーソナルコンピュータ上で行った。

②遺伝子変異が洞結節自動能および興奮伝播に与える影響のシミュレーション解析

洞結節細胞の数学的モデル (Biophys. J. 2008) を用い、チャネル遺伝子変異による膜電流変化が洞結節自動能および結節内興奮伝播に与える影響について解析した。まず遺伝子変異のみられたチャネルの動態を表す定常マルコフ状態モデルを用い、パッチクランプ実験で得られたデータに基づいて、変異チャネル電流の動態を再現できる状態モデルを作成する。この変異チャネルモデルを洞結節細胞モデルに組み込み、自発性活動電位の変化をシミュレートして、チャネルの変異が活動電位パラメータ (自動能頻度) に与える影響を明らかにした。さらに洞結節中心部細胞と辺縁部細胞を連結した 1 次元洞結節モデルを用い、遺伝子変異による洞停止・洞房ブロック発現の可能性を検証する。活動電位の再構成及び活動電位パラメータ計算のための解析システム (プログラム群) は、ワークステーション HP Z800 (Hewlett-Packard Japan, Tokyo) 並びに科学技術計算・シミュレーション用ソフトウェア MATLAB 7 (The MathWorks Inc., USA) を用いて作成した。

(4) 心筋前駆細胞 (Cardiac progenitor cell, CPC) の単離・培養

マウスの心筋組織を細かく切り刻み、フィブロネクチンでコーティングされたディッシュに外植した。数日後に出現する間質様細胞が密集成長した時点で酵素処理を行い回収した。この cardiosphere 形成細胞を cardiosphere 培養液を用いて培養し、増殖

させた。このようにして得られた CPC を本研究に用いた。

(5) 心筋前駆細胞 (CPC) の電気生理学的特徴の検討と RT-PCR による発現遺伝子の同定

ディッシュ上で単層性に増殖させた CPC の電気生理学的特徴を明らかにするため、パッチクランプ法を用いてその活動電位および構成するイオン電流を詳細に検討した。

4. 研究成果

(1) 先天性徐脈症例の臨床的特徴

家族歴のある、あるいは若年発症 (60 歳未満) の先天性徐脈 (洞不全症候群および心臓刺激伝導障害) 症例 58 例の genome DNA および臨床データを集積した (表 1)。56 症例中 26 例 (45%) に家族歴が認められた。洞不全症候群が 38 例、房室ブロックを含む心臓刺激伝導障害が 23 例であった。合併症として心房細動を 29 例に、QT 延長症候群を 4 例に、筋ジストロフィを 5 例に認めた。ペースメーカー植込み症例は 24 例 (41%) であった。

表 1. 症例の臨床的特徴

症例数	58
男性 / 女性	33/25
平均年齢	51±21 歳
家族歴 (%)	26 (45)
洞不全症候群 (%)	38 (68)
心臓刺激伝導障害 (%)	23 (39)
合併症	
心房細動 (%)	29 (50)
QT 延長症候群 (%)	4 (7)
Brugada 症候群 (%)	1 (2)
筋ジストロフィ (%)	5 (9)
ペースメーカー植込み (%)	24 (41)

(2) 遺伝子変異検索結果および臨床像

集積した徐脈患者に対して遺伝子解析を行ったところ、58 症例中 7 症例 (12%) より 7 種類の遺伝子変異を同定した (表 2)。4 症例に家族歴を認め、いずれも徐脈性不整脈以外の合併症を有していた。

表 2. 本研究で同定された遺伝子変異

症例	年齢	性	家族歴	徐脈性不整脈	合併症	遺伝子	アミノ酸変異部位
1.	51	F	あり	SSS+AVB	LQTS	KCNH2 SCN5A	p. R269W p. P1824A
2.	72	F	なし	SSS	LQTS	ANK2	p. W1535R
3.	37	M	あり	SSS+AVB	EDMD	EMD	p. W226X
4.	35	M	あり	SSS+AVB	EDMD	EMD	p. W226X
5.	32	M	あり	AVB	EDMD	EMD	p. Q222X
6.	51	M	なし	SSS	心房細動	KCNA5	p. T527M
7.	59	F	なし	SSS	心房細動	SCN1B	p. T189M

SSS, 洞不全症候群; AVB, 房室ブロック; LQTS, QT 延長症候群; EDMD, エメリードレイフス筋ジストロフィ

症例 1 は 51 歳女性で 4.5 秒の洞停止、房室ブロック、QT 延長が認められ、心筋 K チャネルおよび心筋 Na チャネルの遺伝子変異 (KCNH2 R269W および SCN5A P1824A) を認めた。

症例 2 は 72 歳女性で洞不全症候群に QT 延長を合併し、細胞膜裏打ち構造を構築する蛋白質アンキリンの遺伝子変異 ANK2 W1535R が認められた。本変異は death domain と呼ばれる機能部位に認められた。

症例 3、4、および 5 はエメリードレイフス筋ジストロフィに洞不全症候群あるいは房室ブロックを合併した症例で、すべてペースメーカー植込み術が施行されている。家系内に、多くのペースメーカー植込み症例、突然死症例が認められた。本症例については 2010 年日本循環器学会総会シンポジウムで発表し、大きな反響が得られた。

症例 6 は、洞不全症候群と心房細動を合併した症例で、心筋 K チャネル遺伝子変異 KCNA5 T527M を認めた。

症例 7 は、発作性心房細動を合併し洞性徐脈を認めた症例で SCN1B T189M を認めた。この異常はコントロールではマイナーアレル頻度が 0.3% であり、稀な遺伝子多型と考えられた。

その他、16 症例 (28%) より遺伝子多型を同定した。

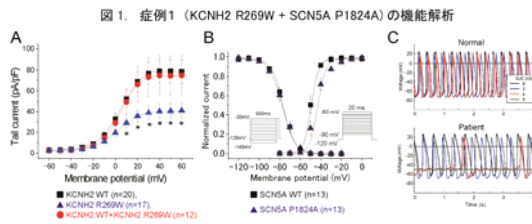
(2) 機能解析結果

本研究で同定された 7 種類の遺伝子変異のうち、KCNH2 R269W、SCN5A P1824A、KCNA5 T527M、SCN1B T189M に対してパッチクランプ法による電気生理学的検討を行った。

① KCNH2 R269W+SCN5A P1824A

パッチクランプ法による検討では、両変異とも機能喪失型変異であった (図 1A, B)。KCNH2 変異は QT 延長に SCN5A 変異は刺激伝導障害と関与していると考えられた。コンピューターシミュレーションによる洞結節周囲細胞のペースメーカー活動の検討において、患者モデルではギャップ結合コンダクタンスの上昇によりペースメーカー活動が停止した

(図 1C)。この研究結果は 2010 年不整脈学会シンポジウム、2010 年 ISHR、2011 年 ACC で発表し、大きな反響を得た。

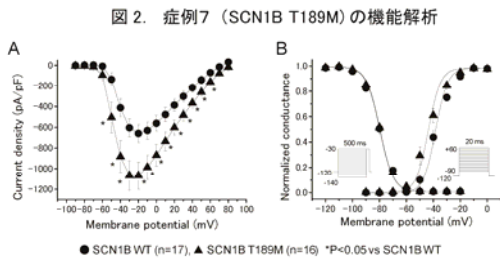


②KCN5A T527M

KCN5A は超迅速活性化 K 電流 I_{Kur} をコードしており、過去の検討では T527M 変異の発現電流は野生型と比較して有意に小であると報告されていたが、我々の検討では発現電流に有意差は認められなかった。

③SCN1B T189M

SCN1B は心筋 Na チャネルの β サブユニットであり、T189M 多型の発現電流は野生型に対して有意に大であり、その活性化曲線は過分極側に変位していた (図 2)。本多型により Na チャネルの機能亢進が生じると予想された。



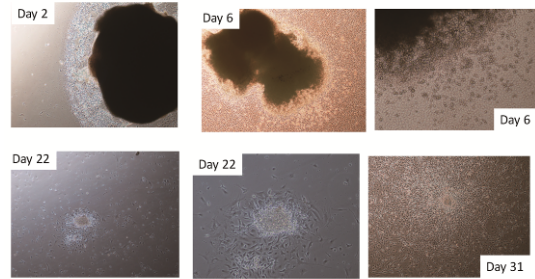
なお、本症例では洞性徐脈と発作性心房細動が認められており、Na チャネルの機能亢進のみではこれらの病態を一元的に説明するのは困難であり、さらなる検討が必要と考えられる。本研究は 2012 年不整脈学会シンポジウムおよび同年の AHA で発表した。

(3) 心筋前駆細胞 (Cardiac progenitor cell, CPC) の単離・培養

新生仔マウス心筋細胞より心筋前駆細胞の単離・培養を試みた。新生仔マウス心筋を切り刻み、組織断片を explants として fibronectin coated dish 上におき、IMDM1, FBS, 抗生物質などの入った培養液を用いて細胞培養を行うと、数日後に explants に付着し、小さく、丸い、明るい細胞 (cardiosphere-forming cells) が出現した (図 3)。Cardiosphere 形成細胞が confluent したところで回収を行い (Day 21)、その後、IMDM, DMEM, FBS, FGF, EGF, B-27,

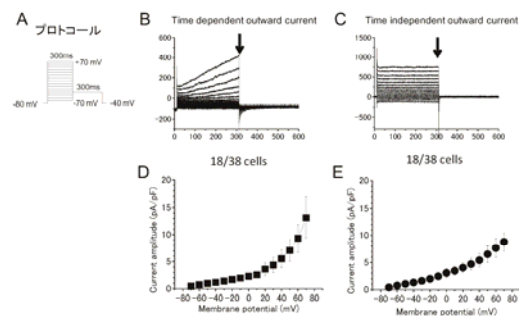
cardiotrophin-1 などを含む cardiosphere medium を用いて培養を行った。約 1 週間後 (Day 31)、培養細胞の中に一部自己拍動性の細胞群を認めた (図 3)。

図 3 Cardiosphere-derived cell の作製・培養



Day30 から Day50 の心筋前駆細胞に対してパッチクランプ法による電気生理学的検討を行った。図 4A に示すプロトコールで外向き電流の評価を行ったところ 38 細胞中 18 細胞で時間依存性の外向き電流 (図 4B) を 38 細胞中 18 細胞で時間非依存性の外向き電流 (図 4C) を認めた。これらは Big conductance calcium-activated potassium channels あるいは遅延整流 K チャネルと考えられる。

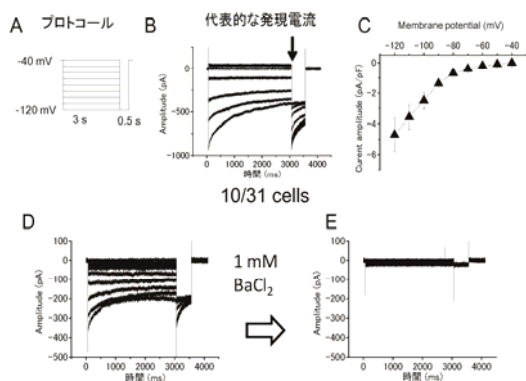
図 4. 代表的な外向き電流と電流電圧曲線



心筋前駆細胞の RT-PCR を行ったところ、Kv1.1, Kv1.2, Kv1.6 の発現が確認されたことより、遅延整流 K 電流が発現していると考えられた。

次に図 5A に示すプロトコールで評価を行ったところ、図 5B のような電流が記録され、バリウムで遮断されたことから内向き整流 K 電流と考えられた。RT-PCR では Kir1.1, Kir2.2, Kir2.3 の発現が確認され、内向き整流 K 電流が発現していると考えられた。

図5. 代表的な内向き整流K⁺電流と電流電圧曲線



なお、本検討では典型的な Na 電流や Ca 電流は記録されなかった。

心筋前駆細胞のみを単離・培養することは実際には困難であり、線維芽細胞などが混在するため、MACS を使用することにより磁気ビーズを用いて C-Kit 陽性の心筋前駆細胞のみを分離し、パッチクランプ法を用いてイオン電流の計測を行った。5 細胞中 4 細胞に遅延整流 K 電流を認めた。

(4) まとめ

本研究により、先天性徐脈と考えられる症例の 12% に遺伝子変異が認められることが明らかとなり、変異を認めた症例は、徐脈性不整脈以外の合併症を認めていた。今後、次世代シーケンサ-などを用いることにより、家族性徐脈性不整脈の分子遺伝学的背景がさらに明らかになると考えられる。

本研究で新生仔マウスの心筋前駆細胞において、遅延整流 K 電流と内向き整流 K 電流の発現が確認されたが、発現電流についてさらなる検討が必要と考えられる。また、心筋前駆細胞を用いた生物学的ペースメーカーの作成については、心筋前駆細胞から洞結節様細胞に大量に分化させる方法の確立など、解決すべき問題点があると考えられる。

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 27 件)

① Kurata Y, (他 3 名). Effect of hyperpolarization-activated current I_f on robustness of sinoatrial node pacemaking: theoretical study on influence of intracellular Na^+ concentration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 査読有 2013

May;304(10):H1337-51.

doi:10.1152/ajpheart.00777.2012

② Liu L, Hayashi K, Fujino N, Yamagishi M, (他 11 名). A novel mutation in the transmembrane nonpore region of the *KCNH2* gene causes severe clinical manifestations of long QT syndrome. *Heart Rhythm*. 査読有 2013 Jan;10(1):61-7. doi:

10.1016/j.hrthm.2012.09.053

③ Kurata Y, (他 2 名). Roles of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} cycling and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in sinoatrial node pacemaking: insights from bifurcation analysis of mathematical models. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 査読有 2012 Jun;1302(11):H2285-300.

doi:10.1152/ajpheart.00221.

④ Nakanishi C, Hayashi K, Yamagishi M (他 7 名). Gene and protein expression analysis of mesenchymal stem cells derived from rat adipose tissue and bone marrow. *Circ J*. 査読有 2011 Aug 25;75(9):2260-8.

⑤ Hayashi K, Fujino N, Yamagishi M (他 14 名). A *KCRI* Variant Implicated in Susceptibility to the Long QT Syndrome. *J Mol Cell Cardiol*. 査読有 2011 Jan;50(1):50-7.

doi:10.1016/j.yjmcc.2010.10.007.

⑥ Kurata Y (他 16 名). Reciprocal control of hERG stability by Hsp70 and Hsc70 with implication for restoration of LQT2 mutant stability. *Circ Res*. 査読有 2011 Feb 18;108(4):458-68.

doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.227835.

⑦ Itoh H, Hayashi K, Yamagishi M, Horie M (他 11 名). Long QT syndrome with compound mutations is associated with a more severe phenotype: A Japanese multicenter study. *Heart Rhythm*. 査読有 2010 Oct;7(10):1411-8.

doi:10.1016/j.hrthm.2010.06.013.

⑧ Hayashi K, Yamagishi M (他 4 名). Trafficking-Competent *KCNQ1* Variably Influences the Function of *HERG* Long QT Alleles. *Heart Rhythm*. 査読有 2010 Jul;7(7):973-80

doi:10.1016/j.hrthm.2010.03.038.

[学会発表] (計 15 件)

- ① 林 研至, 藤野陽, 山岸正和 (他 7 名), Long QT Syndrome Mutation Carriers in Japanese School Children and Their Clinical Course, The 77th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, ラウンドテーブルディスカッション (6), 2013 年 3 月 18 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ② Kenshi Hayashi, Noboru Fujino, Masakazu Yamagishi (他 9 名), Functional Characterization of Cardiac Ion Channel Gene Variants in Lone Atrial Fibrillation, American Heart Association SCIENTIFIC SESSIONS 2012, 2012 年 11 月 3-7 日, Los Angeles Convention Center (USA)
- ③ 林 研至, 藤野陽, 倉田康孝, 山岸正和 (他 7 名), 孤立性心房細動に認められる遺伝子異常とその意義, The 27th Annual Meeting of the Japanese Heart Rhythm Society / Symposium II, 2012 年 7 月 6 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ④ 林 研至, 藤野陽, 山岸正和 (他 7 名), Prevalence and Outcomes of Young Athletes in Congenital Long QT Syndrome: Results from School Cardiac Screening and Gene Analysis, The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society Symposium 12, 2012 年 3 月 16-18 日, Fukuoka International Congress Center (福岡)
- ⑤ 林 研至, 藤野陽, 山岸正和 (他 7 名), Cardiac ion channel mutations in acquired long QT syndrome, The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society Asian Joint Case-Conference 8, 2012 年 3 月 16-18 日, Fukuoka International Congress Center (福岡)
- ⑥ Kenshi Hayashi, Noboru Fujino, Masakazu Yamagishi (他 9 名), Trafficking-Competent KCNQ1 Variably Influences the Function of HERG Long QT Alleles, Heart Rhythm 2011, 32nd Annual Scientific Sessions, 2011 年 5 月 4-7 日, Moscone Center (USA)
- ⑦ Kenshi Hayashi, Noboru Fujino, Yasutaka Kurata, Masakazu Yamagishi

(他 5 名), Characterization of Compound Heterozygosity for Mutations R269W in KCNH2 and P1824A in SCN5A Associated with Long QT Syndrome and Sinus Node Dysfunction, ACC.11 60th Annual Scientific Session, 2011 年 4 月 2-5 日, Morial Convention Center (USA)

- ⑧ 林 研至, 藤野陽, 倉田康孝, 山岸正和 (他 7 名), Genetic analysis for the inherited bradyarrhythmia, The 25th Annual Meeting of the Japanese Heart Rhythm Society / Symposium, 2010 年 6 月 12 日, 名古屋国際会議場 (愛知県)

[その他]

ホームページ等

http://intmed2.w3.kanazawa-u.ac.jp/index_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 研至 (HAYASHI KENSHI)
金沢大学・大学病院・助教
研究者番号：0042642

(2) 研究分担者

藤野 陽 (FUJINO NOBORU)
金沢大学・保健学系・准教授
研究者番号：40361993

倉田 康孝 (KURATA YASUTAKA)
金沢医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00267725

山岸 正和 (YAMAGISHI MASAKAZU)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：70393238

(3) 連携研究者

東田 陽博 (HIGASHIDA HARUHIRO)
金沢大学・子供のこころ発達研究センター・教授
研究者番号：30093066

坂元 裕一郎 (SAKAMOTO YUICHIRO)
金沢大学・大学病院・助教
研究者番号：70467108