

# Brugada症候群の臨床的特徴と心筋Naチャンネル遺伝子に関する分子遺伝学的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/4561">http://hdl.handle.net/2297/4561</a>

## Brugada症候群の臨床的特徴と心筋Naチャネル遺伝子に関する分子遺伝学的研究

金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻血管分子遺伝学

(旧講座名：内科学第二)

(主任：馬淵 宏教授)

伊 藤 英 樹

器質的心疾患を認めないにもかかわらず心室細動が発生する特発性心室細動の患者の中に、安静時12誘導心電図上V1からV2/V3誘導で特徴的なST上昇を認める一群が存在することを1992年にBrugadaらが報告した。自覚症状を認めないにもかかわらず同様の心電図異常を認める症例も含めてBrugada症候群と呼ばれ、家族歴に突然死を有するものも多い。最近の分子遺伝学的解析により、1998年以降一部の家系で心筋Naチャネルの $\alpha$ サブユニットをコードするSCN5A遺伝子の異常が報告されているが、その遺伝子変異部位によっては臨床病型が異なることも予想される。今回著者は北陸地方におけるBrugada症候群患者の不整脈イベントの特徴を解析するとともに、Brugada症候群患者を対象に新しいSCN5A遺伝子変異の検索を行い、その臨床的特徴について検討した。臨床的に診断された40例のBrugada症候群患者において、心室細動あるいは失神発作は17%に認められ、さらに発作性心房細動が25%と高率に認められた。致死性不整脈、失神発作、あるいは発作性心房細動を認めた症例は17例(42%)であった。不整脈事象では、14事象中13事象(92%)が夜間から早期に発生していた。また、不整脈発生直後のSTは13事象中10事象(77%)で前後の心電図と比較して上昇していた。次に、対象者の末梢白血球より分離した高分子DNAを用いてSCN5A遺伝子のエクソン1から28のそれぞれに対応したプライマーを設計し、PCRによりDNA断片を増幅させ、PCR一本鎖構形成多型(PCR-single strand conformational polymorphism)法および直接塩基配列決定法(direct sequence)を用いて遺伝子変異を確認した。Brugada症候群40症例における検討の結果、今までに報告のない新しいSCN5A遺伝子変異を4種類同定した。エクソン7の282番目のアミノ酸ArgをコードするコドンCGCがHisをコードするコドンCACへと変化する変異：Arg282Hisは、36歳で夜間突然死した兄を有し、50歳で心室細動による失神発作を経験した1症例において見い出された。この変異は、SCN5Aの膜貫通領域であるS5からイオン選択性を決定するポア間のアミノ酸変異であり、正常対照者には認められない変異であった。経過観察中心電図異常は変動的であり、また自律神経作動薬の投与によりST形状の変化が見られたことから、Arg282Hisを有する心筋Naチャネルは自律神経活動の影響を受けやすいことが示唆された。エクソン12の568番目のアミノ酸HisをコードするコドンGTGがArgをコードするコドンGAGへと変化する変異：His568Arg、エクソン18の1090番目のProをコードするコドンCCGがLeuをコードするコドンCTGへと変化する変異：Pro1090Leu、エクソン20の1193番目のアミノ酸ArgをコードするコドンCGGがGlnをコードするコドンCAGへと変化する変異：Arg1193Glnはすべてドメインを結ぶ細胞内ループ上の変異で、His568ArgをBrugada症候群の6家系(15%)、Pro1090Leu(5%)を2家系、Arg1193Glnを5家系(12%)に認めたが、正常対照者にもそれぞれ9%、2%、6%に認められる遺伝子多型であった。Brugada症候群患者に致死性不整脈のみならず発作性心房細動が多発しており、これらの不整脈の発生には自律神経活動が関与したさらなるST上昇が関係しているものと推定された。また、SCN5A変異によるBrugada症候群の臨床病型は遺伝子異常の存在する部位によって異なることが考えられ、特に膜貫通領域のポア領域の変異によるBrugada症候群患者は慎重な経過観察が必要であることが示唆された。

**Key words** Brugada syndrome, SCN5A, sudden death, gene mutation, arrhythmogenesis

特発性心室細動は、不整脈を起こしうる明らかな器質的心疾患を認めないにもかかわらず、心室細動をきたし突然死に至る疾患である。欧米では、院外心停止蘇生例の1%にあたり、急性心筋梗塞に伴うものを除けば3~8%にのぼると考えられている。また若年者に多く、40歳以下の心停止例の10~17%を占めるとい<sup>1)</sup>。

1992年Brugadaら<sup>2)</sup>は、特発性心室細動の患者の中に心電図上右側胸部誘導で特徴的なST上昇を認める特異な一群が存在することを報告した。その後同様の症例が多数報告され、検診などを含めた本邦の大規模な調査から、この特徴的な心電図所見の見られる確率は一般住民の0.05%であることが明らかにされた<sup>3)</sup>。無症状であるがBrugada型心電図を呈し突然死の家族歴

平成13年9月28日受付, 平成13年12月6日受理

Abbreviations : PCR-SSCP, PCR-single strand conformational polymorphism; TBE, Tris-boric acid-EDTA

を有する例、検診などで偶然にBrugada型心電図が記録された例<sup>45)</sup>、心房性不整脈など他の不整脈に対しI群抗不整脈薬を投与した際に予期せずBrugada型心電図が発見された例<sup>46)</sup>なども含め、この一群の疾患は現在Brugada症候群 (Brugada syndrome) と呼ばれて、1つの独立した症候群として認知されるようになった。

Alingsら<sup>8)</sup>のレビューによると、163症例のBrugada症候群の患者のうち、150例 (92%) が男性である。また、少なくとも95例 (58%) がアジアからの報告であり、Brugada症候群は日本を含んだアジア地域において高い発生率を示すことが知られている。心事故発生のピークは40歳前後で、比較的若年者に多い。心室細動発生のほとんどが安静時もしくは就寝時に起こっており<sup>9)</sup>、不整脈の発生には自律神経活動の影響が関係しているものと推測されている<sup>10)</sup>。

Brugada症候群の病因は1998年まで不明であったが、約20%に突然死の家族歴を認め、常染色体優性遺伝を示す場合が多いことが知られていた<sup>8)</sup>。1998年にBrugada症候群の3家系において、心筋Naチャンネルの $\alpha$ サブユニットをコードする遺伝子SCN5Aの変異が報告され、本疾患は先天性QT延長症候群に次ぐ新しいチャンネル遺伝子病である可能性が示された<sup>11)</sup>。このような分子遺伝学の進歩に伴ってSCN5A遺伝子変異の解析が進み、現在までに15種類のミスセンス変異と1種類の挿入・欠失 (insertion-deletion) 変異が報告されている<sup>11)~17)</sup>。

Brugada症候群は圧倒的に男性に高い罹患率を示すこと、心電図でのST変化が日内、日差変動を示すこと、さらに自律神経刺激やClass I抗不整脈薬が心電図変化に影響を与えることなどから、Brugada症候群の病態に種々の修飾因子が関与している可能性が示唆されるが、いまだ明らかにはされていない。

したがって、本邦特に北陸地方におけるBrugada症候群患者についてもその臨床的特徴のみならず、遺伝子解析を行って遺伝子型と臨床病型 (表現型) との関連を検討し、それぞれの遺伝子型に特徴的な臨床像を明らかにする必要がある。そこで本研究では、臨床的にBrugada症候群と診断された患者を対象として、臨床的特徴を検討するとともに、SCN5A遺伝子変異の有無を検索し、遺伝子変異に伴う臨床像について検討した。

## 対象および方法

### I. 対象

1998年9月から2000年12月までの間に金沢大学医学部第二内科およびその関連施設に通院、または入院している北陸地方のBrugada症候群患者発端者40例を対象とした。Brugada症候群の診断基準は、安静時12誘導心電図のV2誘導のST上昇度をSTj、V2誘導のj点から40ミリ秒後のST上昇度をST40として、V1からV2またはV3誘導で0.1mV以上のST上昇を認めるもの、V2誘導でJ点から40ミリ秒の点で0.2mV以上のST上昇を認めるもの、V2誘導でJ点のST上昇度がJ点から40ミリ秒の点のST上昇度より大きいもの、または2名の循環器医によりBrugada心電図と認められたものとした<sup>18)</sup>。

### II. 方法

#### 1. 臨床的特徴および不整脈イベントの解析

失神の有無および既往に関しては、患者からの聞き取り調査ならびに診療録により調査した。また患者の標準12誘導心電図、ホルター心電図、および各種心機能検査結果をでき得る限

り収集し、その所見について解析した。不整脈イベントは以下のものと定義し、その種類・頻度について調査した。

- 1) 心室細動あるいは失神発作による突然死の既往
- 2) 抗不整脈薬による治療を要する上記1)以外の不整脈

さらに1) 2)の不整脈の発生時間と発生直後の心電図学的特徴について診療録、標準12誘導心電図、ホルター心電図から検討し、不整脈発生直後の心電図は抗不整脈薬を使用していない時のものを用いて解析した。

#### 2. 心筋Naチャンネル遺伝子解析

##### 1) 高分子DNA抽出

対象者の末梢静脈血10mlをEDTA-2Naを抗凝固剤として採取し4℃にて移送、-20℃にて保存した。この末梢血を室温にて解凍後Triton X-100融解変法<sup>19)</sup>にて高分子DNAを単離した。すなわち融解液 [320mM ショ糖液, 1% Triton X-100, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Tris-HCl (pH 7.6)] にて赤血球を溶血させ、遠心により沈澱として白血球を集めた。これをプロテアーゼ (Sigma, St. Louis, USA) にて消化後、フェノール-クロロホルム (1:1) で1回、続いてクロロホルム-イソアミルアルコール (24:1) にて2回抽出し、最後にエタノール沈澱によりDNAを分離した。こうして得られたDNAをTris-EDTA緩衝液 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA-2Na, pH 8.0) に溶解の上260nmにおける吸光度測定により濃度を求めた。

##### 2. PCR

Wangら<sup>20)</sup>の報告を参考に、ジーンバンクのデータベースに登録されているSCN5A遺伝子配列から、エクソン1からエクソン28について20bp長のプライマー計2組を作成した。エクソン12, 17, 28は2個以上のプライマーによって全塩基配列をカバーした (表1)。Tm値の解析にはMacMelt (tm) ソフトウェア (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA) を使用した。スプライス部位の変異検出のため各プライマーはエクソンに隣接するイントロンを少なくとも5bp含むものとした。

プライマーは、DNA合成機モデルABI381A (Applied Biosystems, Inc., Foster, USA) を用い、ペータシアノエチルホスホアミダイド法<sup>21)</sup>にて合成した。アンモニア水に溶解し、55℃で一晩静置した後-20℃に冷却、真空下で遠心して乾燥、再減菌蒸留水1mlに溶解し、カラムNAP-5 (Pharmacia-LKB, Uppsala, Sweden) に通して精製した。その後200倍に希釈し、260nmでの吸光度より濃度を測定して10 $\mu$ Mになるように濃度を調整した。

DNA断片の増幅にはSaikiら<sup>22)</sup>によるPCR法を用いた。高分子DNA 1 $\mu$ gを鋳型DNAとして40 $\mu$ Mのプライマー1セットと終濃度200 $\mu$ Mの各デオキシヌクレオチド (dATP, dCTP, dGTP, TTP) と2.5単位のTaqポリメラーゼ (Perkin-Elmer-CetusAA, Norwalk, USA) を、0.01%ゼラチンを含む緩衝液 [終濃度10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>] に加え、再減菌蒸留水を計50 $\mu$ lとなるように加えて攪拌した。遠心して反応液を集め、50 $\mu$ lのミネラルオイル (Sigma) を滴下して蒸発を防ぎ、94℃1分、それぞれのプライマーのTm (ただしエクソン1, 25, 28-12はTm値の設定が出来なかった) で1分、72℃1分を基本にそれぞれのセット毎に決定した温度条件のもと、30サイクルの反応を行った。

増幅したDNA断片は、1%の通常のアガロースゲルに鎖長マーカーとして $\Phi$ -X174/Hae III消化物 (東洋紡, 東京) と共に泳動して断片長を確認した。

3. PCR一本鎖構成体多型 (PCR-single strand conformational polymorphism, PCR-SSCP) 法

泳動用緩衝液として Tris-HCl 54g, ホウ酸 27.5g, 0.5M

EDTA 20ml に蒸留水を加え 3L にしたものを保存用の 5× Tris-ホウ酸-EDTA (Tris-boric acid-EDTA, TBE) 泳動用緩衝液とし泳動直前に 1× の濃度に希釈した。

Table 1. Oligonucleotide primers flanking the exons of the SCN5A gene for PCR amplification

Exon	Oligonucleotide name	Sequence	Exon	Oligonucleotide name	Sequence
1	SN1-5	5'-GCCGCTGAGCCTGCGCCAGT-3'	21	SN21-5	5'-TCCAGGCTTCATGTCCACCTGTCT-3'
	SN1-3	5'-GGAAAGTTGGGCGGCGGCAG-3'		SN21-3	5'-TCTCCCGCACCGGCAATGGT-3'
2	SN2-5	5'-GGTCTGCCACCCCTGCTCTCT-3'	22	SN22-5	5'-AGTGGGGAGCTGTTCACCTCCT-3'
	SN2-3	5'-CCTCTTCCCCCTGTCTCCATT-3'		SN22-3	5'-GGACCGCCTCCCACTCC-3'
3	SN3-5	5'-AGTCCAAGGGCTCTGAGCCAA-3'	23	SN23-5	5'-TTGAAAAGGAAATGTGCTCTGGG-3'
	SN3-3	5'-GGTACTCAGCAGGTATTAAGTCAA-3'		SN23-3	5'-AACATCATGGGTGATGGCCAT-3'
4	SN4-5	5'-GGTAGCACTGTCTGGCAGTGAT-3'	24	SN24-5	5'-CTCAAGCGAGGTACAGAATTAATGA-3'
	SN4-3	5'-CCTGGACTCAAGTCCCCCTTC-3'		SN24-3	5'-GGGCTTTCAGATGCAGACACTGAT-3'
5	SN5-5	5'-TCACTCCACGTAAGGAACCTG-3'	25	SN25-5	5'-GCCTGTCTGATCTCCCTGTGTGA-3'
	SN5-3	5'-ATGTGGACTGCAGGGAGGAAGC-3'		SN25-3	5'-CCTGTCTGGTCTCCCTGTGTCA-3'
6	SN6-5	5'-CCTTTCCTCTCACTGTCTGT-3'	26	SN26-5	5'-CCATGCTGGGGCCTCTGAGAAC-3'
	SN6-3	3'-GGTATTCTGGTGACAGGCACATTC-3'		SN26-3	5'-GGCTCTGATGGCTGGCCATGTG-3'
7	SN7-5	5'-CCACCTCTGGTTGCCTACACTG-3'	27	SN27-5	5'-CCCAGCGAGCACTTTCATTTG-3'
	SN7-3	5'-GTCTGCGTCTCACAAAGTCTTC-3'		SN27-3	3'-GCTTCTCCGTCCAGCTGACTTGTA-3'
8	SN8-5	5'-CGAGTGCCCTCACCAGCATG-3'	28	SN28-1-5	5'-TGCACAGTGATGTGGCTGGAA-3'
	SN8-3	3'-GGAGACTCCCTGGCAGGACAA-3'		SN28-1-3	5'-GAAGAGGCACAGCATGCTGTTGG-3'
9	SN9-5	5'-GGGAGACAAGTCCAGCCCAGCAA-3'	SN28-2-5	5'-AAGTGGGAGGCTGGCATCGAC-3'	
	SN9-3	5'-AGCCCACACTGTCTGCCCTTG-3'	SN28-2-3	5'-GTGCTCTCCTCCGTGGCCACGC-3'	
10	SN10-5	5'-ACTTGAAATGCCCTCACCCAGA-3'	SN28-3-5	5'-GAGCCCAGCCGTGGGCATCCT-3'	
	SN10-3	5'-CACCTATAGGCACCATCAGTCAG-3'	SN28-3-3	5'-GTCCCCACTCACCATGGGCAG-3'	
11	SN11-5	5'-AAACGTCCGTTCTCCACTCT-3'	SN28-4-5	5'-CCAACCAGATAAGCCTCATCAACA-3'	
	SN11-3	5'-AACCCACAGCTGGGATTACCATT-3'	SN28-4-3	5'-CCGCCTGCTACGGAAGAGGA-3'	
12	SN12-1-5	5'-GCCAGTGGCTCAAAAAGACAGGCT-3'	SN28-5-5	5'-TGCTGCAACGCTCTTTGAAGCAT-3'	
	SN12-1-3	5'-CCTGGGCACTGGTCCGGCGCA-3'	SN28-5-3	5'-AAAGGCTGCTTTTCAAGTGTCTCT-3'	
	SN12-2-5	5'-CACCAACATCACTGCTGGTGC-3'	SN28-6-5	5'-GGACCGTGAGTCCATCGTGTGA-3'	
	SN12-2-3	5'-GGAAGTGTGATCAGTTTGGGAGA-3'	SN28-6-3	5'-AGCCCATTACAAACATATACAGTCT-3'	
13	SN13-5	5'-CCCTTTTCCCAGCTGACGCAAA-3'	SN28-7-5	5'-CAACTTCATCCCAGCTGCTGAGG-3'	
	SN13-3	5'-GTCTAAAGCAGGCCAAGACAAATG-3'	SN28-7-3	5'-CTCCAGCATCTCAGGTCAAGTG-3'	
14	SN14-5	5'-CAGGAAGGTATTCCAGTTACATATGA-3'	SN28-8-5	5'-TTCAGTCCCAGGGGTGCAATG-3'	
	SN14-3	5'-ACCCATGAAGCTGTGCCAGCTGT-3'	SN28-8-3	5'-CCAGGCCACTCTCCTCTGGAAG-3'	
15	SN15-5	5'-CTTTCCTATCCCAAACAATACCT-3'	SN28-9-5	5'-TCACTCTGGCCCCCTAATTGTCT-3'	
	SN15-3	5'-CCCCACCATCCCCATGCAGT-3'	SN28-9-3	5'-GGTCTGAGGCCCTGGGAGAT-3'	
16	SN16-5	5'-GAGCCAGAGACCTTACAAGTCCCCT-3'	SN28-10-5	5'-GAAGTTCACCAGCCCTGAGCCAT-3'	
	SN16-3	3'-CCCTTGCCACTTACCACAAG-3'	SN28-10-3	5'-TAGGATTGTACAGCAGCTGAAG-3'	
17	SN17-1-5	5'-GGGACTGGATGGCTTGGCATGGT-3'	SN28-11-5	5'-CTAGTCCAATCACCCCAGGA-3'	
	SN17-1-3	5'-CGGGGAGTAGGGGTGGCAATG-3'	SN28-11-3	5'-ATGGGTTGGGCTGGGGTTGC-3'	
	SN17-2-5	5'-GCCAGGGCCAGCTGCCAGCT-3'	SN28-12-5	5'-TTTCTTCTGTACCCCAGTT-3'	
	SN17-2-3	5'-CTGTATATGTAGGTGCCTTATACATG-3'	SN28-12-3	5'-GTAAGCCATTTAATTGGTTTGC-3'	
18	SN18-5	5'-AGGGTCTAAACCCCAGGGTCA-3'	Oligonucleotide primers complementary to DNA sequences flanking exons of the SCN5A gene were synthesized on ABI 380A DNA synthesizer and used to amplify the intervening sequences with PCR.		
	SN18-3	5'-CCCAGCTGGCTTCAGGGACAAA-3'			
19	SN19-5	5'-GAGGCCAAAGGCTGCTACTCAG-3'			
	SN19-3	5'-CCTGTCCCCTCTGGGTGAAACT-3'			
20	SN20-5	5'-ACAGGCCCTGAGGTGGGCCTGA-3'			
	SN20-3	5'-TGACCTGACTTCCAGCTGGAGA-3'			

0.5mM EDTA 2  $\mu$ l, 5N NaOH 10  $\mu$ l, 滅菌再蒸留水 88  $\mu$ l を混合してアルカリ溶液を作り, PCR産物 8  $\mu$ lにアルカリ溶液 2  $\mu$ lを加えて42°C 3分, 95°C 2分加熱後, 0°Cに急冷して一本鎖に変性させた. そのうえで, 10~20%濃度勾配ポリアクリルアミドゲル(アトー, 東京)を用いてTBE緩衝液中で4°Cのもと40V, 24時間で泳動した.

染色にはBIO-RAD銀染色キット(Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA)を用い, プロトコールに従って銀染色を行った. すなわち10%エタノール, 5%酢酸混合液200mlにて15分間ゲルの固定を行い, 酸化剤100mlにて5分間酸化させた. 蒸留水で15分間に水を3回換えながらすすぎ, 余分な酸化剤を除き, 銀染色溶液を加えて20分間振盪させた. その後30秒以内に洗浄し, 現像液を加えてバンドの出現を確認した. ある程度以上バンドが濃くなった時点で蒸留水で1分間すすいだ後, 5%酢酸100mlを加えて反応を停止させた. 30%エタノール, 5%酢酸混合液200mlを保存液とし, 30分以上保存液内にゲルを浸した後, ゲルをセルロースフィルム内に入れて保存した.

1 本鎖に変性させたDNAはヘアピンループなどの分子内高次構造を形成する. この分子構造は1塩基変異によっても大きく影響を受け, 高次構造が大きく変化する. この構造の違いは, ポリアクリルアミドゲル電気泳動で移動度の違いとして検出できる. これを利用し, 正常DNAとともに電気泳動することによって異なるバンドを認めたものを変異DNAとして検出した.

#### 4. 自動化直接塩基配列決定法(direct sequencing)

PCRで増幅したDNA断片を1%の通常のアガロースゲルに鎖長マーカーとして $\Phi$ -X174/Hae III消化物(東洋紡, 東京)と共に泳動し, 断片長を確認した上で, 目的とするDNA断片のバンドを含む部分を切り出した. マイクロピュアとマイクロコン-50(Amicon)を組み合わせてこのDNA断片を10,000 rpmで10分間遠心した. 滅菌蒸留水20  $\mu$ lを加えて再度遠心し, 濃縮すると同時に余分なプライマーおよびヌクレオチドを除去し, 鋳型DNAとした. これにダイ・ターミネーター・サイクルシークエンス・キット(Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, USA)を用いてダイ・ターミネーター法にて反応をおこなった.

自動化直接塩基配列決定法としてABI PRISM<sup>TM</sup>310 Genetic Analyzer(Perkin-Elmer Corporation)を用いた. これはキャピラリー型の塩基配列解析装置で, 読みとられたデータはパーソナルコンピュータPower Macintosh G3(Apple, Cupertino, USA)本体内蔵の固定デスクに数値データとして保存された. 反応終了後に塩基配列解析を自動的に行い, 配列を文字データおよび波形のグラフとして出力した.

本研究は, 総ての患者からインフォームドコンセントを得て行った. また本研究は, 「金沢大学医学部等医の倫理委員会」で審査され, 承認を受けている(研究許可年月日:平成13年4月27日, 許可番号:164 & 165, 課題名:Brugada症候群におけるSCN5A遺伝子の解析).

## 成 績

### I. 臨床的特徴

#### 1. Brugada症候群の臨床的特徴

患者背景を表2に示す. 男性37例, 女性3例で, 年齢は24から88歳(50 $\pm$ 12歳, 平均 $\pm$ 標準偏差)であった. 循環器科に通院中の症例は19例, 他科に通院中の症例は10例で, 検診で偶然Brugada心電図を見い出されたものが11例であった. 上向きに凸でドーム様のcoved型と呼ばれるST上昇は32例に認められ, 馬鞍様のsaddle-back型は8例であった(図1). 抗不整脈薬は6例(15%)に投与されていた. 3親等内の家族に突然死を認めるものは6例(15%)であった. 心臓超音波検査は39例, 6METs以上の運動負荷心電図は28例, 心臓カテーテル検査は17例に施行されたがいずれも異常は認められなかった. Vaughan-Williams分類<sup>23)</sup>のIA群あるいはIC群である抗不整脈薬(dysopyramide 2mg/分/10分; flecainide 2mg/kg/10分; pilsicainide 1mg/分/10分; あるいは経口pilsicainide 100~150mg/日)が16例に投与され, 15例(93%)でSTは投与前と比較してさらに上昇した. 心電図経過を追えた39例のうち, 37例では経過観察中にSTの形状が著明に変化し, 2例ではST上昇が消失した.

#### 2. 不整脈の解析

致死性不整脈, 失神発作を40例中7例に認め, 4例(10%)に心室細動が確認された. 失神発作は3例(7%)に認められた. また, 発作性心房細動を12例(25%)に認め, 17例(42%)で致死性不整脈, 失神発作あるいは発作性心房細動が認められた. 致死

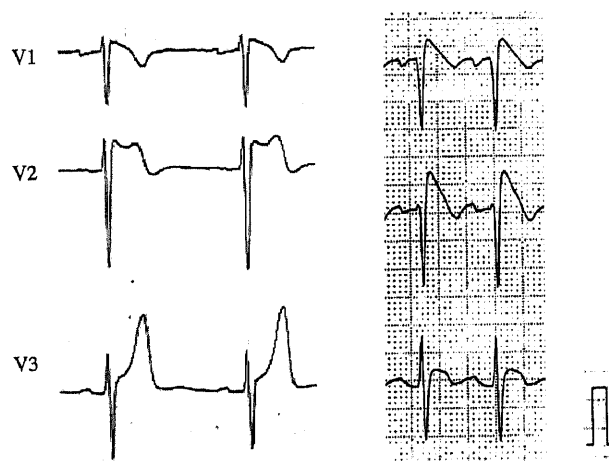


Fig. 1. Leads V1 to V3 electrocardiograms in patients with the characteristic Brugada electrocardiogram. Note "saddle-back type" (the left side) and "coved type" (the right side). The calibration is 10mm/mV.

Table 2. Characteristics of patients with Brugada syndrome

Exp.No (n)	Age (yrs)	Gender male/female	ST form in initial ECG coved type/saddle-back type	ST during the follow up (n=39) variable ST/normalized ST	Medications antiarrhythmic drugs	Provocation test (n=16) positive/negative
40	50 $\pm$ 12*	37/3	32/8	37/2	6	15/1

\*Data is  $\bar{X} \pm SD$

Table 3. Arrhythmic events in patients with Brugada-type electrocardiographic findings

Case no.	Onset age (years)/ Gender	Arrhythmic events	Arrhythmic event at night		ST-segment elevation	
			SCD	AF	SCD	AF
1	24/M	SCD	-	/	NA	/
2	37/M	SCD	+	/	NA	/
3	45/M	SCD	+	/	-	/
4	51/M	SCD	+	/	+	/
5	58/M	SCD	+	/	+	/
6	52/F	SCD/AF	+	+	+	+
7	53/M	SCD/AF	+	+	+	+
8	31/M	AF	/	+	/	-
9	45/M	AF	/	+	/	+
10	<50/M	AF	/	NA	/	NA
11	<65/M	AF	/	NA	/	NA
12	70/M	AF	/	+	/	+
13	72/M	AF	/	+	/	+
14	72/M	AF	/	NA	/	-
15	73/M	AF	/	NA	/	NA
16	77/M	AF	/	+	/	+
17	88/M	AF	/	NA	/	NA

M, male; F, female; SCD, ventricular fibrillation or syncope; AF, paroxysmal atrial fibrillation; night, 17.00h~9.00h; +, positive; -, negative; NA, not available; /, not detected.

性不整脈, 失神発作は全例夜間から早朝にかけて発生し, 発作直後の心電図が確認しえた4例では発作直後に全例STが著明に上昇していた. 発作性心房細動は7例中6例が夜間から早朝にかけて発生し, 発作直後の心電図が確認しえた9例中6例で発作直後のST上昇は著明であった. 総不整脈事象14事象中13事象(92%)が夜間から早朝に発生していた. また不整脈発生直後のSTは, 13事象中10事象(77%)で不整脈発作前後の心電図と比較してさらに上昇していた(表3).

## II. 心筋Naチャンネル遺伝子解析

### 1. PCR-SSCPの結果

Brugada症候群発端者40例に対するPCR-SSCP法による検討の結果, 図2に示すように心筋NaチャンネルSCN5A遺伝子エクソン7において1例, エクソン12において6例, エクソン18において2例, エクソン20において5例異常バンドが認められた. エクソン12, エクソン18, エクソン20の異常バンドはPCR-SSCP上それぞれ同じ異常バンドであった. 異常バンドが認められたエクソンについては, 引き続き直接塩基配列決定法による変異の同定を行った.

### 2. エクソン7塩基配列の決定

#### 1) PCR-SSCP法による異常バンドの検出

PCR-SSCP法によるエクソン7のスクリーニングで, Brugada症候群発端者BS-021において異常バンドが検出された(図2).

#### 2) 直接塩基配列決定法による遺伝子変異配列の決定

発端者BS-021の心筋Naチャンネル遺伝子エクソン7における塩基配列解析の結果, 282番目のArgをコードするCGCがHisをコードするCACへと変化していた(図3). 変異したAのバンドと正常なGのバンドが共存しており, 変異Arg282Hisのヘテロ接合体であった. この変異は正常対照者100名には認められなかった. また, この変異は今までに報告のない新変異であった.

#### 3) 同変異での臨床病型の検討

本症例は, 50歳時に意識消失発作を認めて近医に搬送された.

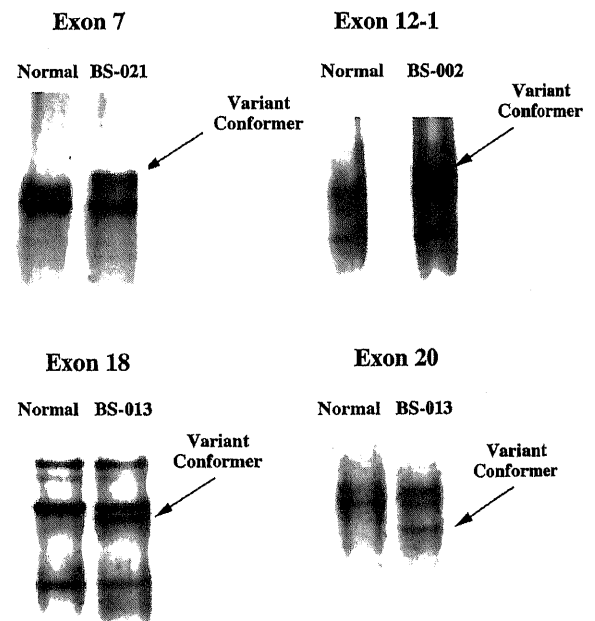


Fig. 2. PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) analysis in the exon 7 (proband 21), exon 12 (proband 2), exon 18 (proband 13), and exon 20 (proband 13) of the human cardiac sodium channel gene. The proband show the mutational patterns with variant conformer.

50歳以前に失神発作を認めたことは1度もなく, 発症当日も夕食後午後10時に前ぶれなく意識消失発作を認めた. 救急車で搬送中頻回に意識消失を認めるとともに, モニター心電図上図4下段に示すような多形性心室頻拍が記録された. 来院時の12誘導心電図は図4上段に示すように, 心拍数77/分の洞調律でV1からV3誘導でST上昇を認めたが, 急性心筋梗塞時に認められるような胸痛症状はなく, 生化学データ上心筋逸脱酵素の上昇も認めなかった. 心臓超音波検査上, 左室壁運動は良好でそ

の他異常所見を認めなかった。図5に本例の心電図経過を示す。49歳時(98/1/10)の心電図ではST上昇はごく軽度であるが、発症直後に著しいST上昇が認められ、その後STの形状が変化した。本症例のST変動に自律神経活動の関与が強く疑われたた

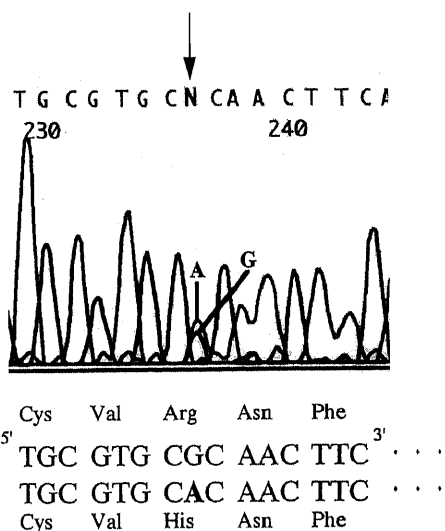


Fig. 3. Automated fluorescent direct sequencing of the exon 7 of the human cardiac sodium channel gene. Each curve indicates A, adenine; C, cytosine; G, guanine; and T, thymine. The graph is the result of proband 21. The arrow indicates A peak of the mutant and G peak of the wild type.

め、図6のように自律神経作動薬の負荷を行った。抗コリン作用を有するアトロピン2 mgを静脈内投与後、STは最大0.8mVまで上昇した。一方、β刺激作用を有するイソプロテノール0.05 μg/分を静脈内投与後ST上昇は消失し、本症例のST上昇ならびにその形状は自律神経作動薬によって変化した。多形性心室頻拍が頻発し、心室細動への移行も認められて電気的除細動を必要としたため、心臓カテーテル検査を含む心精査後に植え込み型除細動器 (ICD) が植え込まれた。図7に示すように、本症例には36歳で突然死した兄が存在し、遺伝子解析を含む家系調査を勧めたが同意は得られなかった。

3. エクソン12塩基配列の決定

1) PCR-SSCP法による異常バンドの検出

PCR-SSCP法によるエクソン12のスクリーニングで、Brugada症候群発端者BS-002, BS-012, BS-016, BS-023, BS-025, BS-026において同一パターンの異常バンドが検出された(図2)。

2) 直接塩基配列決定法による遺伝子変異配列の決定

発端者BS-002の心筋NaチャンネルSCN5A遺伝子エクソン12における塩基配列解析の結果、568番目のHisをコードするGTGがArgをコードするGAGへと変化していた(図8)。変異したGのバンドと正常なAのバンドが共存しており、変異His568Argのヘテロ接合体であった。Brugada症候群発端者BS-012, BS-016, BS-023, BS-025, BS-026も同一の変異であった。この変異は、正常対照者100名における検討の結果9%に認められた。

4. エクソン18塩基配列の決定

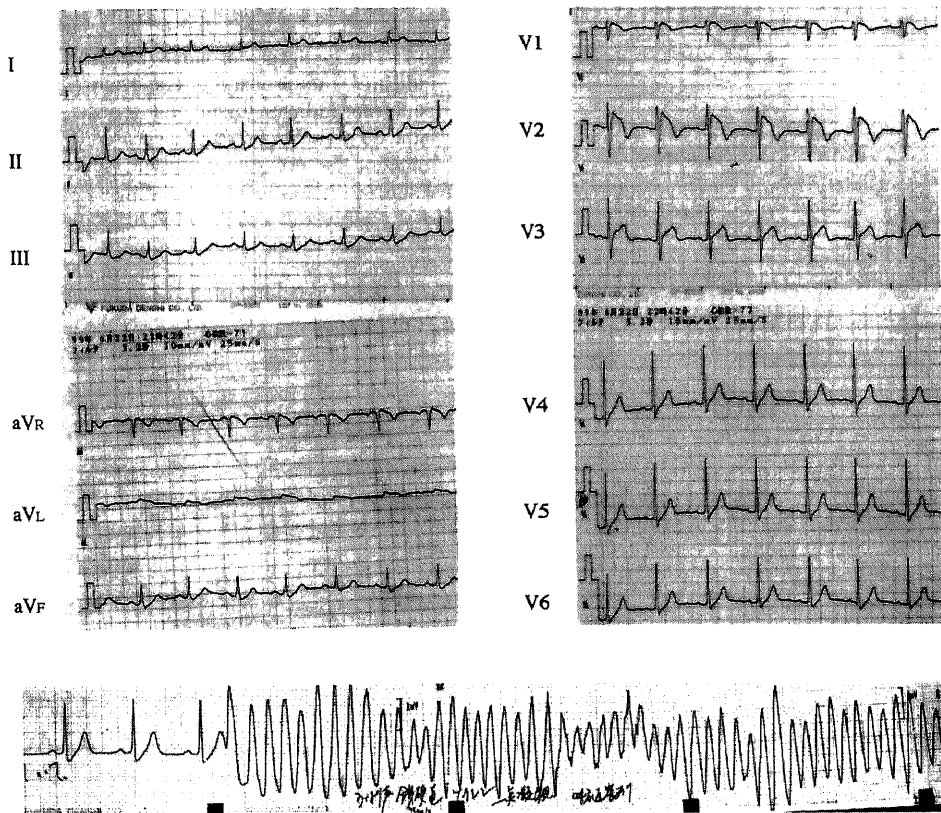


Fig. 4. Twelve-lead electrocardiograms on admission (top) and polymorphic ventricular tachycardia (bottom). Note the ST segment elevation in leads V1 through V3.

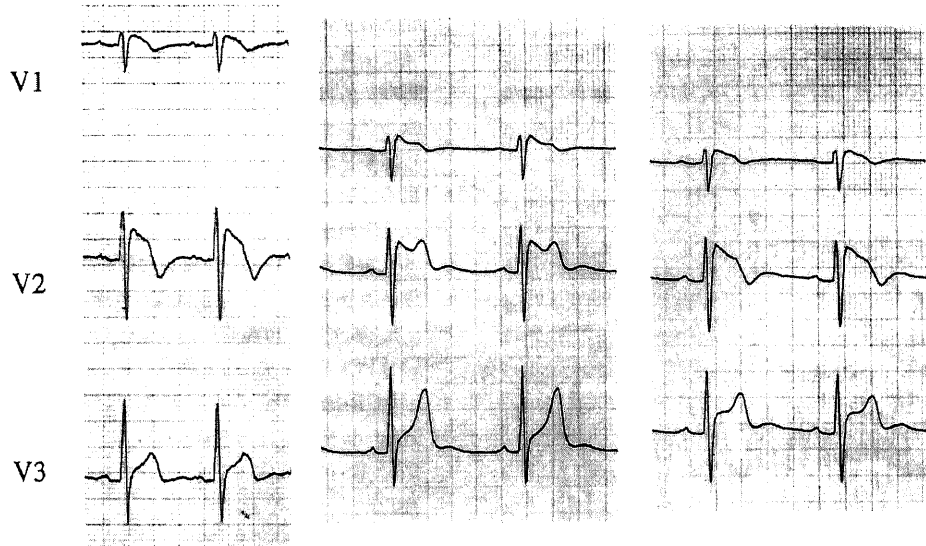


Fig. 5. Dynamic changes of electrocardiograms during the follow-up period. Note the ST-segment elevation in leads V1 through V3.

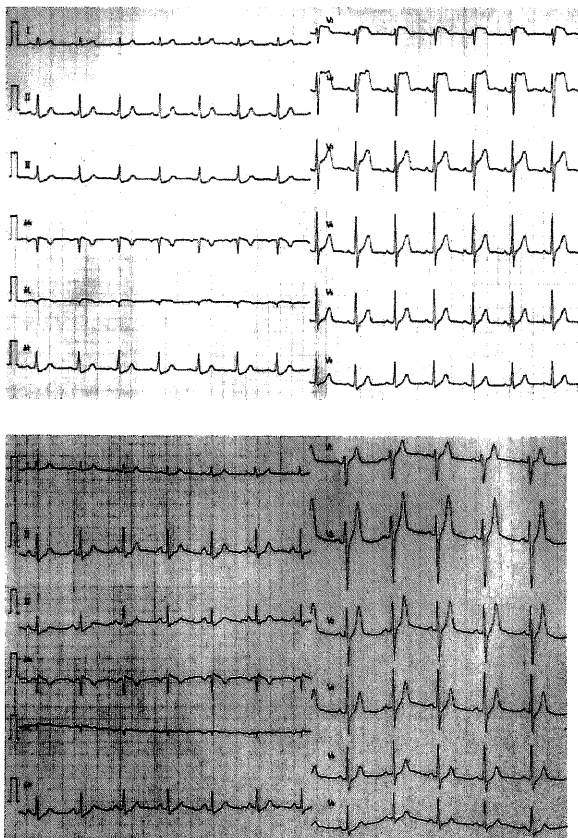


Fig. 6. Changes of ST-segment elevation after the infusion of atropine (top) and isoproterenole (bottom). ST-segment elevation of covered type changed to saddle-back type after the infusion of atropine. On the other hand ST-segment elevation disappeared after the infusion of isoproterenole.

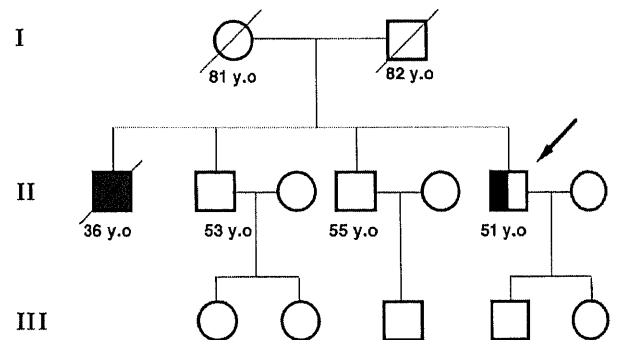


Fig. 7. The pedigrees of family 21. The arrow in the pedigree indicates the proband. The square and the circle in the pedigree indicate male and female, respectively. I, II, III indicate generations;  $\emptyset$ ,  $\square$  deceased;  $\circ$ ,  $\square$  not investigated;  $\blacksquare$  mutation (heterozygote) present, clinically affected;  $\square$ , sudden death.

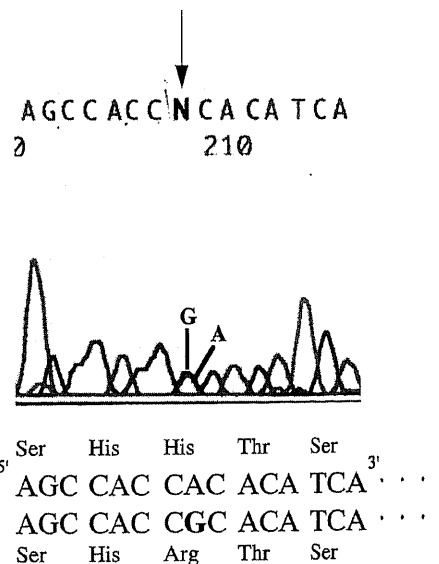


Fig. 8. Automated fluorescent direct sequencing of the exon 12 of the human cardiac sodium channel gene. Each curve indicates A, adenine; C, cytosine; G, guanine; and T, thymine. The graph is the result of proband 2. The arrow indicates A



1) PCR-SSCP法による異常バンドの検出

PCR-SSCP法によるエクソン18のスクリーニングで、Brugada症候群発端者BS-013, BS-022において同一の異常バンドが検出された(図2).

2) 直接塩基配列決定法による遺伝子変異配列の決定

発端者BS-013の心筋Naチャンネル遺伝子エクソン18における塩基配列解析の結果、1090番目のProをコードするコドンCCGがLeuをコードするCTGへと変化していた(図9). 変異したTのバンドと正常なCのバンドが共存しており、変異Pro1090Leuのヘテロ接合体であった。この変異は、正常対照者100名における検討の結果2%に認められた。

5. エクソン20塩基配列の決定

1) PCR-SSCP法による異常バンドの検出

PCR-SSCP法によるエクソン20のスクリーニングで、Brugada症候群発端者BS-013, BS-016, BS-022, BS-024, BS-038において異常バンドが検出された(図2).

2) 直接塩基配列決定法による遺伝子変異配列の決定 (家系21)

発端者BS-013の心筋NaチャンネルSCN5A遺伝子エクソン20における塩基配列解析の結果、1193番目のArgをコードするコドンCGGがGlnをコードするコドンCAGへと変化していた(図10). 変異したAのバンドと正常なGのバンドが共存しており、変異Arg1193Glnのヘテロ接合体であった。この変異は、正常対照者100名における検討の結果6%に認められた。

Ⅲ. 新しい心筋Naチャンネル遺伝子変異部位と頻度調査

以上、北陸地方の独立したBrugada症候群40症例を対象とし、心筋Naチャンネル遺伝子変異の頻度調査を行った結果、1症例(2.5%)に正常対照者に認められない新変異Arg282Hisを確認した。この変異は、図11に示すように心筋Naチャンネルの膜貫通領域であるS5からイオン選択性を決定するポア間のアミノ酸変異であった。Brugada症候群患者にHis568Argを15%, Pro1090Leuを5%, His1193Glnを12.5%検出した。これらの変

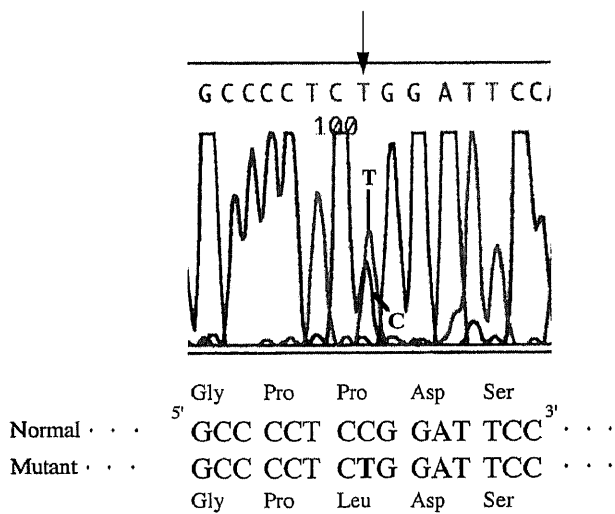


Fig. 9. Automated fluorescent direct sequencing of the exon 18 of the human cardiac sodium channel gene. Each curve indicates A, adenine; C, cytosine; G, guanine; and T, thymine. The graph is the result of proband 13. The arrow indicates T peak of the mutant and C peak of the wild type.

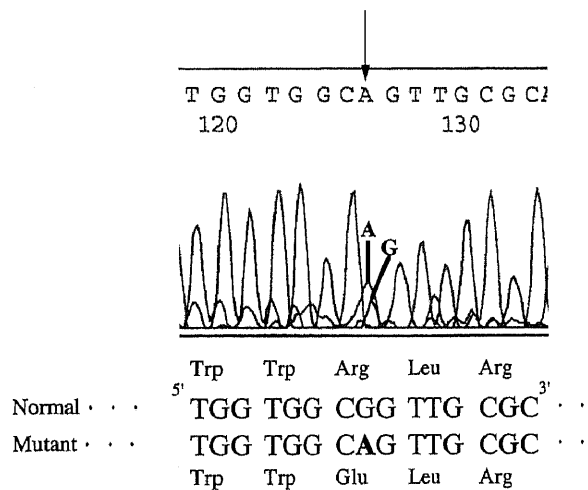


Fig. 10. Automated fluorescent direct sequencing of the exon 20 of the human cardiac sodium channel gene. Each curve indicates A, adenine; C, cytosine; G, guanine; and T, thymine. The graph is the result of proband 13. The arrow indicates A peak of the mutant and G peak of the wild type.

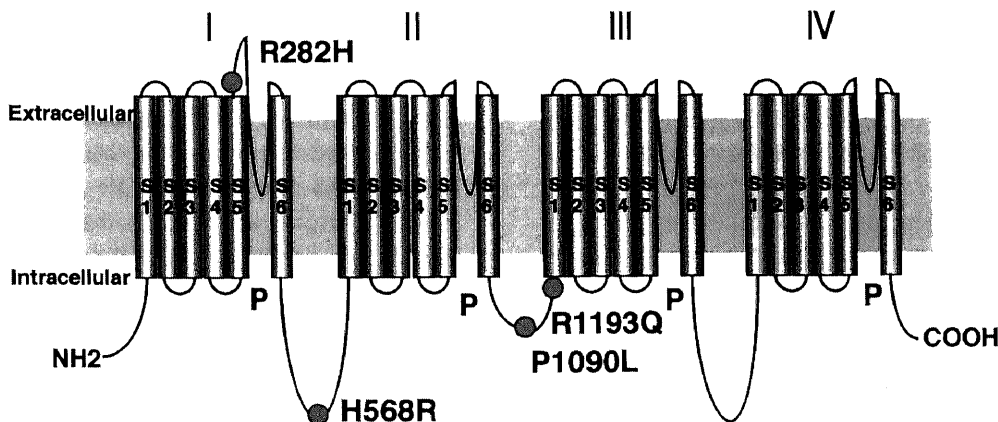


Fig. 11. SCN5A mutations identified in present study and predicted topology of SCN5A<sup>20</sup>

Table 4. Amino acid sequence alignment of the exon 7 and 12 of different v-gated cardiac sodium channels

Voltage-gated cardiac sodium channels		Amino acid sequence alignment
<b>EXON 7</b>		
Homo SCN5A	R282H mutation	<u>L</u> Q <u>L</u> F <u>M</u> G <u>N</u> L <u>R</u> H <u>K</u> C <u>V</u> H <u>N</u> F <u>T</u> A <u>L</u> N <u>G</u> T <u>N</u> G <u>S</u> V <u>E</u> A <u>D</u> G <u>L</u>
Homo SCN5A		<u>L</u> Q <u>L</u> F <u>M</u> G <u>N</u> L <u>R</u> H <u>K</u> C <u>V</u> R <u>N</u> F <u>T</u> A <u>L</u> N <u>G</u> T <u>N</u> G <u>S</u> V <u>E</u> A <u>D</u> G <u>L</u>
Rattus norvegicus		<u>L</u> Q <u>L</u> F <u>M</u> G <u>N</u> L <u>R</u> H <u>K</u> C <u>V</u> R <u>N</u> F <u>T</u> E <u>L</u> N <u>G</u> T <u>N</u> G <u>S</u> V <u>E</u> A <u>D</u> G <u>L</u>
Mus musculus		<u>L</u> Q <u>L</u> F <u>M</u> G <u>N</u> L <u>R</u> H <u>K</u> C <u>V</u> R <u>N</u> F <u>T</u> E <u>L</u> N <u>G</u> T <u>N</u> G <u>S</u> V <u>E</u> A <u>D</u> G <u>I</u>
Human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel alpha subunit (HH1)		<u>L</u> Q <u>L</u> F <u>M</u> G <u>N</u> L <u>R</u> H <u>K</u> C <u>V</u> R <u>N</u> F <u>T</u> A <u>L</u> N <u>G</u> T <u>N</u> G <u>S</u> V <u>E</u> A <u>D</u> G <u>L</u>
Rat cardiac specific sodium channel alpha-subunit		<u>L</u> Q <u>L</u> F <u>M</u> G <u>N</u> L <u>R</u> H <u>K</u> C <u>V</u> R <u>N</u> F <u>T</u> E <u>L</u> N <u>G</u> T <u>N</u> G <u>S</u> V <u>E</u> A <u>D</u> G <u>L</u>
Home SCN4A		<u>L</u> Q <u>L</u> F <u>M</u> G <u>N</u> L <u>R</u> Q <u>K</u> C <u>V</u> R <u>W</u> P <u>P</u> F <u>N</u> D <u>T</u> N <u>T</u> W <u>Y</u> S <u>N</u> D <u>T</u>
Homo hNE-Na		<u>L</u> Q <u>L</u> F <u>M</u> G <u>N</u> L <u>K</u> H <u>K</u> C <u>F</u> R <u>N</u> S <u>L</u> E <u>N</u> N <u>E</u> T <u>L</u> E <u>S</u> I <u>M</u> N <u>T</u> L <u>E</u> S
<b>EXON 12-1</b>		
Homo SCN5A	H568R mutation	T <u>A</u> R <u>E</u> S <u>E</u> S <u>H</u> R <u>T</u> S <u>L</u> L <u>V</u> P <u>W</u> P <u>L</u> R <u>R</u> T <u>S</u> A <u>Q</u> Q <u>P</u> S <u>P</u> G <u>T</u> S
Homo SCN5A		T <u>A</u> R <u>E</u> S <u>E</u> S <u>H</u> H <u>T</u> S <u>L</u> L <u>V</u> P <u>W</u> P <u>L</u> R <u>R</u> T <u>S</u> A <u>Q</u> Q <u>P</u> S <u>P</u> G <u>T</u> S
Rattus norvegicus		T <u>A</u> G <u>E</u> S <u>E</u> S <u>H</u> R <u>T</u> S <u>L</u> L <u>V</u> P <u>W</u> P <u>L</u> R <u>H</u> P <u>S</u> A <u>Q</u> Q <u>P</u> G <u>P</u> G <u>A</u> S
Mus musculus		T <u>A</u> G <u>E</u> S <u>E</u> S <u>H</u> R <u>T</u> S <u>L</u> L <u>V</u> P <u>W</u> P <u>L</u> R <u>R</u> R <u>S</u> T <u>Q</u> Q <u>P</u> G <u>F</u> G <u>T</u> S
Human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel alpha subunit (HH1)		T <u>A</u> R <u>E</u> S <u>E</u> S <u>H</u> H <u>T</u> S <u>L</u> L <u>V</u> P <u>W</u> P <u>L</u> R <u>R</u> T <u>S</u> A <u>Q</u> Q <u>P</u> S <u>P</u> G <u>T</u> S
Rat cardiac specific sodium channel alpha-subunit		T <u>A</u> G <u>E</u> S <u>E</u> S <u>H</u> R <u>T</u> S <u>L</u> L <u>V</u> P <u>W</u> P <u>L</u> R <u>H</u> P <u>S</u> A <u>Q</u> Q <u>P</u> G <u>P</u> G <u>A</u> S

Underline, segment 5 in domain I, Arrow, position corresponding to codon 282 and 568 in SCN5A.

異はすべてドメインを結ぶ細胞内ループ上の変異で、正常対照者にもそれぞれ9%, 2%, 6%認められた。

### 考 察

1998年にSCN5A遺伝子変異がBrugada症候群の病因であると報告されたが<sup>11)</sup>, 以後その他の原因遺伝子は報告されておらず、本研究では、SCN5A遺伝子変異について検討した。

心筋Naチャンネルは、活動電位の急速な立ち上がり(第0相)を構成するイオンチャンネルであり、イオン通過孔を形成する巨大な $\alpha$ サブユニットとその調節サブユニットである $\beta$ 1,  $\beta$ 2サブユニットによって構成される膜蛋白である。Naチャンネル $\alpha$ サブユニットをコードする遺伝子はヒトでは12以上存在することが知られており、その多くは組織特異性の高い発現形式を示す。それに対し $\beta$ 1,  $\beta$ 2サブユニットはそれぞれ単一遺伝子である。ヒト心筋Naチャンネル $\alpha$ サブユニット(hH1)は第3番染色体(3p21)に存在するSCN5Aという遺伝子によってコードされ、ほぼ心筋特異的に発現する。SCN5Aは80kbにわたる遺伝子で、28個のエクソンを持つ。心筋Naチャンネルは4つの大きな疎水性ドメイン(D1-D4)が細胞内外のループによってつながった構造をしており、それぞれのドメインには6つの $\alpha$ ヘリックス構造(S1-S6)が存在する。そのうちS5とS6を結ぶ細胞外ループの一部は膜内に貫入する構造をもち、それらが4つ集まることによって中心孔を形成すると考えられている。また、S4は陽電荷をもつアミノ酸が配列しており、これらが電位を感知してチャンネルの立体構造を変化させチャンネルを開口(活性化)する。また、D3とD4を結ぶ細胞内ループ(ID3-4)はチャンネル孔を内側からふさぐことによってチャンネルを不活性化すると考えられている<sup>24)</sup>。

1998年以来、Brugada症候群の家系に心筋Naチャンネル $\alpha$ サブユニット遺伝子(SCN5A)の変異が報告されてきた。SCN5Aは先天性QT延長症候群(LQT3)<sup>24)</sup>や家族性進行性心臓ブロック[(progressive cardiac conduction defect, PCCD)またはLev-Lenegre症候群]<sup>25)</sup>の原因遺伝子でもある。これらの3つの心

筋Naチャンネル病は、骨格筋、脳、末梢神経、心臓などに発現する様々なNaチャンネルを原因遺伝子とする「Naチャンネル病(Na channelopathies)」の一部といえる。

Brugada症候群においては、Na電流が低下(loss-of function)することがST上昇の原因であると推測されている<sup>26)</sup>。挿入変異によるスプライシング異常、塩基変異によるスプライシング異常、塩基欠失による読み取り枠シフト<sup>11)</sup>は、チャンネルとしては機能をなくしてしまう。D3/S5-S6ループ上の変異として報告された本邦Brugada症候群例R367Hもチャンネルとしての機能はみられない<sup>14)</sup>。このような変異を1つの対立遺伝子を持つヘテロ個体では、心筋のNa電流は理論上正常の半分になるため、上述の理論をあてはめると心電図上STが上昇することが理解できる。

一方、このような機能チャンネルの「量的な変化」を来す変異とは別に、多くのミスセンス変異ではチャンネル機能が質的に変化することによって心筋Na電流が減少することが推測される。これらの変異チャンネルの機能は、アフリカツメガエル卵母細胞(oocytes)や培養細胞を用いて電気生理学的に解析され、Brugada症候群の病態が分子レベルで次第に明らかにされつつある。Baroudiら<sup>27)</sup>は、Brugada症候群における変異チャンネルはoocyteで発現させた時と哺乳類細胞で発現させた時ではその機能が大きく異なるため、発現系の違いを十分に考慮に入れる必要性を指摘した。また、Dumaineら<sup>28)</sup>はT1620Mチャンネルを哺乳類細胞に発現させ、室温ではなく32℃という生理的に近い温度でパッチクランプをすると、Na電流の減衰が野生型に比べて著明に加速することを見出し、測定温度の重要性を唱えた。Brugada症例の一部には発熱時にST上昇が増強する例があり、今回著者が見出したArg1193Gln変異例の中にも発熱時にのみST上昇を認めた症例が存在し、発現型を用いた変異チャンネルの機能変化を検討する余地がある。今回我々が見出したR282H変異はドメインIのセグメント5とセグメント6の間の変異であるが、この部位は心筋に特異的な部位でNグリコシド結合によって糖鎖が付加されており、これらの糖鎖構

造は生合成後のチャネル分子の立体構造の形成や細胞膜への組み込み過程に重要といわれている。また R282H 変異は心筋に特異的な構造部位であるが遺伝子多型である H568R と違い比較的保存されている (表 4)。ただし、遺伝子の保存状態は病原性とかならずしも一致しないようである。例えば L567Q はドメイン I とドメイン II の間のリンカーに存在する非保存領域の変異<sup>29)</sup>であるが重度の遺伝子異常であることが発現実験からも証明され<sup>30)</sup>、幼少期の突然死との関連が報告されている。このように、今回著者が見出した遺伝子異常も機能解析を発現実験によって証明する必要がある。

臨床病型については、無症または心電図異常を有さない遺伝子異常保有者が多く、浸透率が低いことがあげられる。Brugada 症候群<sup>31)</sup>は、T1620M 変異をもった Brugada 症候群の浸透率は 25% であるが Na チャネルブロッカーを使用することで 100% その異常者を見出せると報告している。一方 Priori 症候群<sup>13)</sup>は、Brugada 症候群に 7 種類の SCN5A 遺伝子異常をいろいろな部位に見出し家系調査を行ったところ、発症者以外の遺伝子異常保有者は全例心電図異常が認められず、Na チャネルブロッカーによっても心電図異常が見い出せたのは 34% であったと極めて低い浸透率を報告している。今回の検討では家族調査は行われていないが、今後 SCN5A 遺伝子変異の部位による浸透率の違いを検討をする必要がある。また、Brugada 症候群は圧倒的に男性に高い罹率を示す理由や心電図が日内、日差変動を示すメカニズム、さらに自律神経刺激や Class I 群抗不整脈薬が心電図を変化させるメカニズムなど、変異部位に対する修飾因子の与える影響を検討する必要がある。

Brugada 症候群患者において SCN5A 遺伝子変異が同定されるのは全体の数%~15%前後と陽性率が比較的低い<sup>13)</sup>。その原因として、PCR-SSCP などの遺伝子スクリーニング法の精度などの技術的な問題や、遺伝子変異がプロモーター領域やイントロンなど解析が十分に行われていない領域にある可能性も考えられる。さらに強く推定されるのは、Brugada 症候群も QT 延長症候群と同様に、SCN5A 以外の多数の疾患遺伝子をもつ症候群である可能性ある。心電図における ST 上昇は Na 電流の低下ばかりではなく、Ca 電流の低下、K 電流の増加によっても起こりうる。従って、これらのイオンチャネルのみならず、間接的に影響を及ぼすトランスポーター、受容体などの遺伝子に異常がある可能性も否定できない。一過性外向き K チャネルをコードする K チャネル (Kv 4.2, Kv 4.3 など) や心筋 Ca チャネルの遺伝子は最も注目される遺伝子である。最近 London 症候群<sup>32)</sup>は、SCN 5 A の近傍に Brugada 症候群の 2 つ目の遺伝子座 (3p22-25) を同定した。この遺伝子領域には SCN10A, SCN11A, SCN12A など SCN5A 以外の Na チャネル遺伝子が存在しており、今後の遺伝子スクリーニングの対象とする必要があるかもしれない。また最近 Brugada 症候群と同様の心電図異常を呈した症例で不整脈源性右室異形成症と診断された症例が報告されており<sup>33)</sup>、今回遺伝子異常が見い出せなかった症例に不整脈源性右室異形成症が存在する可能性も否定できない。

遺伝子異常保有者が多く存在することから、家族に原因不明の突然死を認めた場合、本症例を疑い遺伝子異常の検索をすることが必要であろう。今後、SCN5A 以外の原因遺伝子をさらに検討し、臨床像を比較検討する必要があると考えられる。

今回遺伝子検索とあわせて Brugada 症候群の不整脈イベントも検討したが、従来から報告されてきた心室細動あるいは失神

発作をきたす致死性心室性不整脈のみならず発作性心房細動が多く認められた。電気生理学的検査上、Brugada 症候群では心室細動だけでなく心房細動の易誘発性も報告されており、Brugada 症候群と発作性心房細動の関係についても今後の検討が必要である。

## 結 論

日本人 Brugada 症候群患者において、その臨床的特徴と心筋 Na チャネル遺伝子変異の検討を行い、以下の知見を得た。

1. 心室細動あるいは失神発作を 17% に認め、欧米の報告と同じ頻度であった。また、発作性心房細動が 25% と高率に認められ、これまでに報告がない新知見であった。これらの不整脈は夜間から早朝にかけて頻発し、発症直後の ST はさらに上昇していた。

2. 心筋 Na チャネル SCN5A 遺伝子変異を PCR-SSCP 法、直接塩基配列決定法および PCR-RFLP 法を用いて検討した。1 症例において、エクソン 7 の 282 番目のアミノ酸 Arg をコードするコドン CGC が His をコードするコドン CAC へと変化する変異 Arg282His を検出した。これまでに報告のない新変異であり、正常対照者 100 例には認められない変異であった。この患者は 50 歳の時に心室細動による失神発作を認めた。心電図上 ST 上昇度およびその形態は経時的に変化した。また自律神経作動薬の投与で ST は変化し、特に  $\beta$  刺激剤の点滴で ST は正常化した。この家系内には 36 歳時に突然死した兄を認めた。この変異は心筋 Na チャネルの膜貫通領域である S5 からイオン選択性を決定するポア間のアミノ酸変異であり、重度な臨床病型と関係していると考えられた。

3. 6 症例において、心筋 Na チャネル SCN5A 遺伝子エクソン 12 の 568 番目のアミノ酸 His をコードするコドン CAC が Arg をコードするコドン CGC へと変化する変異 His568Arg、2 症例において、エクソン 18 の 1090 番目のアミノ酸 Pro をコードするコドン CCG が Leu をコードするコドン CTG へと変化する変異 Pro1090Leu、5 症例において、エクソン 20 の 1193 番目のアミノ酸 Arg をコードするコドン CGG が Gln をコードするコドン CAG へと変化する変異 Arg1193Gln を検出した。これらの変異はすべてドメインを結ぶ細胞内ループ上の変異でこれまでに報告がなく新変異であったが、正常対照者にもそれぞれ 9%、2%、6% 認められた。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師 馬淵 宏教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を直接御指導、御教示頂きました金沢大学大学院医学系研究科血管分子遺伝学の清水 賢巳助教授に心から謝意を表します。また、多大なる御協力を頂きました金沢大学大学院医学系研究科血管分子遺伝学の第四研究室各位、ならびに高分子 DNA の採取等に際し御協力を頂いた山本幸夫氏、池多亜沙子氏、谷口 尊子氏に感謝いたします。

本研究の一部は 49th Annual Scientific Session of American College of Cardiology (2000 年, Anaheim, USA), 74th Scientific Sessions of American Heart Association (2001 年, Anaheim, USA) において発表した。

## 文 献

- 1) Viskin, Belhassen B. Idiopathic ventricular fibrillation. *Am Heart J* 120: 661-671, 1990
- 2) Brugada R, Brugada J. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a

- distinct clinical and electrocardiographic syndrome: mlyicenter report. *J Am Coll Cardiol* 20: 1391-1396, 1992
- 3) 戸田雄子, 中沢 潔, 小沢 敦. 右脚ブロックパターンとST上昇型心電図の疫学. *心電図* 15: 223-226, 1995
  - 4) Bertaglia E, Michieletto M, Spedicato L, Pascotto P. Right bundle branch block, intermittent ST segment elevation and inducible ventricular tachycardia in an asymptomatic patient: unusual presentation of the Brugada syndrome? *G Ital Cardiol* 28: 893-898, 1998
  - 5) Takenaka S, Emori T, Koyama S, Morita H, Fukushima K, Ohe T. Asymptomatic form of Brugada syndrome. *PACE* 22: 1261-1263, 1999
  - 6) Fujiki A, Usui M, Nagasawa H, Mizumaki K, Hayashi H, Inoue H. ST segment elevation in the right precordial leads induced with class IC antiarrhythmic drugs: insight into the mechanism of Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 10: 214-218, 1999
  - 7) Krishnan SC, Josephson ME. ST segment elevation induced by class IC antiarrhythmic agents: underlying electrophysiologic mechanisms and insights into drug-induced proarrhythmia. *J Cardiovasc Electrophysiol* 9: 1167-1172, 1998
  - 8) Alings M, Wilde A. "Brugada syndrome" ; clinical data and suggested pathophysiological mechanism. *Circulation* 99, 666-673, 1999
  - 9) Matsuo K, Kurita T, Inagaki M, Kakishita M, Aihara N, Shimizu W, Taguchi A, Suyama K, Kamakura S, Shimomura K. The circadian pattern of the development of ventricular fibrillation in patients with Brugada syndrome. *Eur Heart J* 20, 465-470, 1999
  - 10) Kasanuki H, Ohnishi S, Ohtuka M, Matsuda N, Nirei T, Isogai R, Shoda M, Toyoshima Y, Hosoda S. Idiopathic ventricular fibrillation induced with vagal activity in patients without obvious heart disease. *Circulation* 95: 2277-2285, 1997
  - 11) Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, Brugada R, Brugada J, Brugada P, Potenza D, Moya A, Borggrefe M, Breithardt G, Ortiz-lopez R, Wang Z, Antzelevitch C, O' Brien R, Schulze-Bahr E, Keating MT, Towbin JA, Wang Q. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 392: 293-296, 1998
  - 12) Rook MB, Alshinawi CB, Groenewegen WA, Gelder I, Ginneken A, Jongasma HJ, Mannens M, Wilde A. Human SCN5A gene mutations alter cardiac sodium channel kinetics and are associated with the Brugada syndrome. *Cardiovasc Res* 44: 507-517, 1999
  - 13) Priori SG, Napolitano C, Gasparini M, Pappone C, Bella PD, Brignole M, Giordano U, Giovannini T, Menozzi C, Bloise R, Crotti L, Terreni L, Schwartz PJ. Clinical and genetic heterogeneity of right bundle branch block and ST-segment elevation syndrome. *Circulation* 102: 2509, 2000
  - 14) Takehara N, Kawabe J, Sato N, Kawamura Y, Hasebe N, Kikuchi K, Makita N. A novel sodium channel mutation in a variant form of Brugada syndrome. *Circulation* 102: II-677, 2000
  - 15) Deschenes I, Baroudi G, Berthet M, Barde I, Chalvidan T, Denjoy I, Guicheney P, Chahine M. Electrophysiological characterization of SCN5A mutations causing long QT (E1784K) and Brugada (R1512W and R1432G) syndromes. *Cardiovasc Res* 46: 55-65, 2000
  - 16) Veldkamp MW, Viswanathan PC, Bezzina C, Baartscheer A, Wilde AA, Balsler JR. Two distinct congenital arrhythmias evoked by a multidysfunctional Na(+) channel. *Circ Res* 86: E91-7, 2000
  - 17) Akai J, Makita N, Sakurada H, Shirai N, Ueda K, Kitabatake A, Nakazawa K, Kimura A, Hiraoka M. A novel SCN5A mutation associated with idiopathic ventricular fibrillation without typical ECG findings of Brugada syndrome. *FEBS Lett* 479: 29-34, 2000
  - 18) Itoh H, Shimizu M, Ino H, Yamaguchi M, Mabuchi H, Hokuriku Brugada Study Group. Arrhythmias in patients with Brugada-type electrocardiographic findings. *Jpn Circ J* 65: 483-486, 2001
  - 19) Vandenplas S, Wild I, Rabie AG, Brebner K, Ricketts M, Wallis G, Bester A, Boyd C, Mathew C. Blot hybridization analysis of genomic DNA. *J Med Genet* 21: 164-172, 1984
  - 20) Wang Q, Li Z, Shen J, Keating MT. Genomic organization of the human SCN5A gene encoding the cardiac sodium channel. *Genomics* 34: 9-16, 1996
  - 21) Beaucage SL, Caruthers MH. Deoxynucleoside phosphoramidites- a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett* 22: 1859-1862, 1982
  - 22) Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified  $\alpha$ -globin and HLA-DQ $\alpha$  DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324: 163-166, 1986
  - 23) Vaughan Williams EM. Subgroups of class I antiarrhythmic drugs. *Eur Heart J* 5: 96-98, 1984
  - 24) Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA, Keating MT. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 80: 805-811, 1995
  - 25) Schott JJ, Alshinawi C, Kyndt F, Probst V, Hoorntje TM, Hulsbeek M, Wilde AA, Escande D, Mannens MM, Le Marec H. Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat Genet* 23: 20-21, 1999
  - 26) Antzelevitch C, Yan GX, Shimizu W. Transmural dispersion of repolarization and arrhythmogenicity: the Brugada syndrome versus the long QT syndrome. *J Electrocardiol* 32: 158-165, 1999
  - 27) Baroudi G, Carbonneau E, Pouliot V, Chahine M. SCN5A mutation (T1620M) causing Brugada syndrome exhibits different phenotypes when expressed in *Xenopus* oocytes and mammalian cells. *FEBS Lett* 467: 12-16, 2000
  - 28) Dumaine R, Towbin JA, Brugada P, Vatta M, Nesterenko DV, Nesterenko VV, Brugada J, Brugada R, Antzelevitch C. Ionic mechanisms responsible for the electrocardiographic phenotype of the Brugada syndrome are temperature dependent. *Circ Res* 85: 803-809, 1999
  - 29) Priori SG, Napolitano C, Giordano U, Collisani G, Memmi M. Brugada syndrome and sudden death in children. *Lancet* 355: 808-809, 2000

- 30) Wan X, Chen S, Sadeghpour A, Wang Q, Kirsch GE. Accelerated inactivation in a mutant Na<sup>+</sup> channel associated with idiopathic ventricular fibrillation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280 : H354-H360, 2001
- 31) Brugada R, Brugada J, Antzelevitch C, Kirsch GE, Potenza D, Towbin JA, Brugada P. Sodium channel blockers identify risk for sudden death in patients with ST-segment elevation and right bundle branch block but structurally normal hearts. *Circulation* 101: 510-515, 2000
- 32) London B, Barmada M, Nguyen T, Cavlovich D, Seibel JS, Angelilli TA, Palmer AD, Mcnamara DM, Weiss R. Identifying a second Brugada syndrome locus on chromosome 3. *Circulation* 102: II-280, 2000
- 33) Corrado D, Basso C, Buja G, Nava A, Rossi L, Thiene G. Right bundle branch block, right precordial ST-segment elevation, and sudden death in young people. *Circulation* 103 : 710-717, 2001

**Clinical Characteristics and SCN5A Gene Mutations in Patients with Brugada Syndrome** Hideki Itoh, Department of Molecular Genetics of Cardiovascular Disorders, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, **110**, 348 — 359 (2001)

**Key words** Brugada syndrome, SCN5A gene, sudden death, arrhythmogenesis, gene mutation

#### Abstract

Brugada syndrome is characterized by a marked ST-segment elevation in the right precordial leads and is associated with a high risk for sudden death. Some reports have indicated SCN5A gene as the candidate gene causing Brugada syndrome. We analyzed not only arrhythmic events but also SCN5A gene mutations in 40 patients with Brugada syndrome to evaluate the genotype-phenotype correlations. Seven patients (17%) experienced ventricular fibrillation or syncope (aborted SCD) and the other 33 patients had no aborted SCD. Paroxysmal atrial fibrillation was present in 10 of the 40 patients (25%) and events of aborted SCD and/or paroxysmal atrial fibrillation occurred in 17 patients (42%). Arrhythmic events, that were aborted SCD or paroxysmal atrial fibrillation, occurred frequently at night and the ST-segment was elevated more prominently when arrhythmic events occurred. In SCN5A gene analysis of all patients by PCR-SSCP and direct sequence methods, 4 novel sequence variations leading to amino acid replacement (R282H, H568R, P1090L, and R1193Q) were identified in the patients. A 51 year-old man with a R282H mutation in the S5-pore lesion had ventricular fibrillation at night and had a elder brother with sudden death at 32 years of age. This patient had circadian the ST-segment variations, and autonomic nervous drugs could change the degree and the form of ST-segment elevation. R282H mutation was not detected in any of 100 normal control subjects. However H568R, P1090L, and R1193Q mutations in linkers of domain I - II or domain II - III were also found in the normal control subjects (9%, 2%, 6%, respectively). Brugada syndrome seems to be related not only to aborted SCD but also to paroxysmal atrial fibrillation, and may be related to pronounced ST-segment elevation. And the SCN5A gene mutation in the S5-pore region could be the cause of typical Brugada syndrome. ST-segment elevation in patients with this mutation may be influenced by the autonomic nervous function.