

平成 22 年 4 月 4 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19790520

研究課題名（和文） 分子遺伝学的手法による心房細動発症機構の解明と心房細動アップストリーム治療の評価

研究課題名（英文） Molecular genetics of atrial fibrillation and evaluation of upstream therapy for atrial fibrillation

研究代表者

林 研至（HAYASHI KENSHI ）

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：00422642

研究成果の概要（和文）：心房細動はその原因究明、対策が社会的に重要な不整脈である。心房細動は、肥大型心筋症患者の 5～23%程度に発症し、また、明らかな基礎疾患を有さない孤立性心房細動も数多く存在し、その 15%は家族歴を有することが知られている。我々は孤立性もしくは家族性心房細動 75 症例に対して遺伝子解析を行い、3 種類の遺伝子変異を同定した。また、肥大型心筋症患者で、アンジオテンシン II タイプ I 受容体 A/C 多型あるいはトロポニン遺伝子（TNNT2, TNNI3）変異を有する患者はより心房細動を発症しやすいことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： Atrial fibrillation (AF) has an enormous social impact because of its very high incidence, its potential for devastating clinical consequences, and the difficulty of its management . Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is well known risk factor for AF. However, significant proportions of patients, up to 30% in some large studies, develop AF in the absence of risk factors. We performed genetic analysis for 75 patients with lone or familial AF, and identified 3 mutations. We also clarified that the HCM patients with angiotensinogen 1 A/C polymorphism, TNNT2 mutation, or TNNI3 mutation easily develop AF compared to those without these polymorphism or mutations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心臓病態学

1. 研究開始当初の背景

心房細動は65歳以上の高齢者の約6%に発症すると考えられており、わが国の成績では60歳代では0.5%、80歳代では2.5%に発症すると報告されている。その罹病率は経年的に増加し、ことに男性で著しい。心房細動はいったん発症すると心不全の増悪や心房性脳塞栓症を容易に発症するなどその原因究明、対策が社会的にも重要である。最近、社会的高活動層において本疾患によって身体的ハンディキャップを背負うケースが多発しており、本疾患が抱える問題がいかに大きいかをうかがい知ることが出来る。心房細動は高血圧、僧帽弁膜症、虚血性心疾患、心筋症、甲状腺機能亢進症など、心房の圧負荷ないし容量負荷、心房筋の線維化をきたす病態が要因として知られている。例えば、肥大型心筋症に心房細動を伴う頻度は5~23%程度と高頻度である。明らかな基礎疾患を有さない孤立性心房細動も数多く存在するが、孤立性心房細動の15%は家族歴を有し、かつ若年発症であることが知られるようになった（家族性心房細動）。

これまで、家族性心房細動に対して遺伝子解析が行われ、遅延整流K電流をコードするKCNQ1, KCNH2, KCNE2, KCNA5、内向き整流K電流をコードするKCNJ2、細胞間ギャップ結合の蛋白質コネキシン40をコードするGJA5などの遺伝子の突然変異が同定され、機能解析や家族解析などにより心房細動発症の責任遺伝子であると考えられてきた。また、心房細動発症にKCNE1, アンジオテンシノーグ

ン遺伝子、コネキシン40遺伝子などの遺伝子多型が関与しているという報告もある。これらの遺伝子の多くは、心房筋活動電位を構成するイオンチャネルをコードする遺伝子、もしくは、心房筋のリモデリングに関与する蛋白質をコードする遺伝子であるが、未だ解析されていない遺伝子、蛋白質が存在する。また、遺伝子変異から心房細動発症の機構に関しては不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、①家族性心房細動症例における原因遺伝子の検索すること、②同定された遺伝子変異の実験モデルによる機能解析、薬物感受性の評価を行うこと、③肥大型心筋症患者における心房細動発症に関わる遺伝子多型を同定することであった。その内容を要約すると：①北陸地方の関連病院と連携して、若年発症および家族性心房細動多数例を網羅的に集積・把握し、これらの患者において、その原因遺伝子を包括的に検索・同定した。さらに、原因遺伝子のみならず、臨床病型に影響を与える遺伝子多型を検索した。②同定した原因遺伝子変異を細胞やマウスに導入して、パッチクランプ法等を用い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、心房細動に対する有効な治療法、予防法、および効果的薬剤創薬の可能性を追究した。③金沢大学病院では北陸地方の関連病院と連携して、肥大型心筋症380家系を集積・把握している。これまでの報告では、肥大型心筋症患者における心房細動発症の要

因として、左房拡大、年齢、心不全が重要とされていたが、遺伝子多型が発症要因として重要かどうか詳細な検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 若年発症および家族性心房細動症例のサンプル収集

家族性心房細動症例における原因遺伝子の検索を行うため、金沢大学病院を拠点として合計 75 症例（女性 20 名、平均発症年齢 47 歳）の家族性または若年発症性の心房細動例を集積した。

(2) 家族性心房細動の遺伝子変異の検索および家族調査ならびに臨床的特徴の把握

集積したこれらの心疾患患者において、その原因遺伝子を包括的に検索し、同定した。末梢白血球より genomic DNA を抽出し、各々の遺伝子に対応して作成されたプライマーを用いて PCR 法にて増幅した。PCR にて増幅された DNA は、SSCP 法でスクリーニングを行い、異常バンドを認めた者に対しては、オートシーケンサーを用いて DNA 配列を調べる。さらに、原因遺伝子のみならず、臨床病型に影響を与える遺伝子多型を検索した。検索した遺伝子は、*KCNQ1*, *KCNH2*, *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNA5*, *KCNJ2*, *GJA5* の他、*SCN5A* (Na 電流)、*HCN4* (過分極誘発内向き電流)、*KCNJ3* および *5* (アセチルコリン感受性 K 電流)、*NPPA* とした。遺伝子変異が見出された場合には、その家族に同意を得た後、12 誘導心電図、遺伝子診断用採血 (EDTA 血 10ml) を行って家系調査を実施した。

(3) 心房細動患者で同定された遺伝子変異の実験モデルによる機能解析、薬物感受性の評価

同定された原因遺伝子変異を細胞やマウスに導入して、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、心房細動に対する有効な治療法、予防法、および効果的薬剤創

薬の可能性を追究した。具体的には、Site directed mutagenesis法を用いて作成した変異遺伝子発現ベクターを FuGENE6 試薬 (Roche) を用いて、CHO-K1細胞に変異cDNAとEGFP cDNAをトランスフェクションさせた。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 (Axiovert 10, Carl Zeiss) 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。パッチクランプを行う際、ヒーターコントローラを用いてチャンバーを一定温度にして生理的に近い条件で電流測定を行った。さまざまな薬剤によるイオンチャネルの感受性についても検討した。データの収集および解析は、pCLAMP software (version 8.0) と Digi DATA 1321 A/D converter (Axon Instruments, Foster City, USA) を用いてパーソナルコンピュータ上で行った。

(4) 肥大型心筋症患者における心房細動発症に関わる遺伝子多型の同定

金沢大学病院で集積・把握している肥大型心筋症 380 家系に対し PCR-SSCP 法によるスクリーニングを行い、異常が認められた場合はシーケンス法による塩基配列の決定を行った。対象とした遺伝子は、ACE 遺伝子、AT1 遺伝子、アンジオテンシノーゲン遺伝子とした。さらに、肥大型心筋症で心房細動を発症した群において認められる遺伝子異常もしくは多型が心房細動発症の修飾因子となっているかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) 若年発症もしくは家族性心房細動症例の臨床的特徴

家族性心房細動症例における原因遺伝子の検索を行うため、金沢大学病院を拠点として心房細動例の収集を行い、若年発症および家

族性心房細動 75 症例を集積した。このうち、女性は 20 例で、心房細動の平均発症年齢は 47 歳であった。発作性心房細動は 41 例で、16 例に家族歴が認められた。また、6 例に徐脈性不整脈の合併が認められた。

(2) 遺伝子解析結果

75 症例に対し、PCR-SSCP 法あるいは HL-1 法によるスクリーニングおよびシーケンス決定を行った。対象遺伝子は *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNA5*, *KCNJ2*, *GJA5*, *SCN1B*, *NPPA* とした。遺伝子解析の結果、*KCNH2* T436M、*SCN5A* R986Q、*SCN5A* A1186T のそれぞれの遺伝子変異を同定し、遺伝子多型である *KCNQ1* P448R を 1 例、*KCNE1* G38S を 3 例、*KCNE1* D85N を 1 例、*SCN5A* R1193Q を 2 例に認めた。

KCNH2 T436M は、41 才より心房細動が認められる男性より同定された。本人以外に父と 3 人の兄弟に心房細動が認められた。本変異は以前 QT 延長症候群症例より同定されている変異であった。*SCN5A* R986Q は、58 歳時に発症した孤立性の発作性心房細動の男性より同定された。*SCN5A* A1186T は孤立性心房細動症例の女性より同定された。

(3) 肥大型心筋症患者における心房細動発症に関わる遺伝子多型の同定

肥大型心筋症患者において心房細動発症に関わっていると考えられる遺伝子多型の検討を行った。4 種類の遺伝子 (*MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3*) のいずれかに遺伝子変異を有する肥大型心筋症患者 135 症例に対し、RAS 系の遺伝子多型 (アンジオテンシン変換酵素挿入/欠失, ACE I/D; アンジオテンシノーゲン M235T, AGN M235T; アンジオテンシン II タイプ I 受容体 A/C1166, AT1 A/C1166) の解析を行い、心房細動発症との関係について検討を行った。135 症例中 32 症例 (23%) に心房細動が発症していた。RAS の代表的な

遺伝子多型の頻度と心房細動の発症とは関連が認められなかったが、AT1 A/C 多型の HCM 患者は A/A 多型の患者と比べてより早い時期に心房細動発症が認められた。

また、遺伝子変異が決定された肥大型心筋症患者 134 人を対象として遺伝子変異と心房細動発症の関係を検討したところ、32 人 (24%) に心房細動の発症が認められ、ロジスティック回帰分析により、左房径および年齢がその発症に関わっていた。また、カプラーンマイヤー曲線により、トロポニン遺伝子 (*TNNT2*, *TNNI3*) 変異を有する患者はそれ以外の遺伝子 (*MYH7*, *MYBPC3*) 変異を有する患者と比較してより早い時期に心房細動発症が認められた。

発作性もしくは家族性心房細動 75 症例に対する遺伝子解析の結果、3 症例に遺伝子異常が認められた (発症率 4%)。また、肥大型心筋症に対する遺伝子変異および多型の解析の結果、アンジオテンシン II タイプ I 受容体 A/C 多型をもつ肥大型心筋症患者は、A/A 多型の患者と比べてより早い時期に心房細動を発症し、トロポニン遺伝子 (*TNNT2*, *TNNI3*) 変異を有する患者はそれ以外の遺伝子 (*MYH7*, *MYBPC3*) 変異を有する患者と比較してより早い時期に心房細動を発症することが明らかになった。

現在、本研究で同定した 3 種類の遺伝子変異の電気生理学的特徴を明らかにするため、変異 cDNA を作成しパッチクランプ法による検討を予定している。また、肥大型心筋症患者を、アップストリーム治療として一定の評価を得ている ACEI、ARB、スタチン系薬物、T 型 Ca チャネル遮断薬投与、非投与群に分け、心房細動の発症の有無を前向きに調査したい。

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4件)

1. Hayashi K, Shuai W, Sakamoto Y, Higashida H, Yamagishi M, Kupersmidt S. Trafficking-Competent KCNQ1 Variably Influences the Function of HERG Long QT Alleles. **Heart Rhythm.**, in press, 査読有
2. Uchiyama K, Hayashi K, Fujino N, Sakamoto Y, Yamagishi M. 他5名 2番目: Impact of QT variables on clinical outcome of genotyped hypertrophic cardiomyopathy. **Ann Noninvasive Electrocardiol.** (2009) 14:65-71, 査読有
3. Hayashi K, Fujino N, Uchiyama K, Ino H, Sakata K, Konno T, Masuta E, Funada A, Sakamoto Y, Tsubokawa T, Nakashima K, Liu L, Higashida H, Hiramaru Y, Shimizu M, Yamagishi M. Long QT syndrome and associated gene mutation carriers in Japanese children: results from ECG screening examinations. **Clin Sci (Lond).** 2009 Sep 21;117(12):415-24. 査読有
4. Funada A, Hayashi K, Ino H, Fujino N, Uchiyama K, Sakata K, Masuta E, Sakamoto Y, Tsubokawa T, Yamagishi M. Assessment of QT intervals and prevalence of short QT syndrome in Japan. **Clin Cardiol.** 2008 Jun;31(6):270-4. 査読有

[学会発表] (計5件)

1. 舟田 晃、藤野 陽、林 研至、井野 秀一、山岸 正和 パネルディスカッション 7「心房細動の治療戦略」PD-7-3「肥大型心筋症における心房細動発症と対

策：原因遺伝子が同定された症例群での検討」第57回日本心臓病学会学術集会 Sep. 19, 2009 ロイトン札幌(北海道)

2. Funada A, Ino H, Fujino N, Hayashi K, Uchiyama K, Masuta E, Sakamoto Y, Tsubokawa T, Muramoto A, Yamagishi M, Impact of renin-angiotensin system polymorphisms on occurrence of atrial fibrillation associated with heart failure in hypertrophic cardiomyopathy: results from clinical and gene analyses of genotyped patients. American College of Cardiology 58th annual scientific session, Mar. 29, 2009, Orange county convention center (USA)
3. Funada A, Ino H, Fujino N, Hayashi K, Uchiyama K, Masuta E, Sakamoto Y, Tsubokawa T, Muramoto A, Yamagishi M, Impact of troponin-gene mutations on occurrence of atrial fibrillation and development of left atrial dilatation in hypertrophic cardiomyopathy. 第73回日本循環器学会総会・学術集会 Mar. 28, 2009 大阪国際会議場(大阪府)
4. Funada A, Ino H, Fujino N, Hayashi K, Uchiyama K, Sakata K, Masuta E, Fujita T, Sakamoto Y, Tsubokawa T, Yamagishi M. Impact of angiotensin II Type 1 receptor A/C1166 gene polymorphism on the onset of atrial fibrillation in genotyped hypertrophic cardiomyopathy, 第72回日本循環器学会総会・学術集会、2008年3月28日、福岡国際会議場(福岡県)
5. Funada A, Ino H, Fujino N, Hayashi K, Uchiyama K, Sakata K, Masuta E, Fujita T, Sakamoto Y, Tsubokawa T, Yamagishi

M. Association between atrial fibrillation and left atrial diameter in genotyped populations of hypertrophic cardiomyopathy: results from a longitudinal study, 第 72 回日本循環器学会総会・学術集会、2008 年 3 月 28 日、福岡国際会議場（福岡県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 研至 (HAYASHI KENSHI)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：00422642