

平成 2 6 年 5 月 2 2 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591078

研究課題名（和文）ゼブラフィッシュを用いた遺伝性不整脈の病態解明と治療法の確立

研究課題名（英文）Gene analysis for the inherited arrhythmia and functional characterization of disease-causing rare variants by using zebrafish

研究代表者

蒲生 忠継（GAMOU, TADATSUGU）

金沢大学・大学病院・医員

研究者番号：10579634

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,900,000 円、（間接経費） 1,170,000 円

研究成果の概要（和文）： QT延長症候群（LQTS）90症例中27症例（30％）に、若年発症徐脈58症例中7症例（12％）に、孤立性心房細動90症例8症例（9％）に遺伝子変異が認められた。

同定された遺伝子変異に対して機能解析を行ったところ、QT延長症候群で同定された12遺伝子変異、若年発症の徐脈の2変異、孤立性心房細動の2変異は機能喪失変異であり、孤立性心房細動3変異は機能亢進変異であった。ゼブラフィッシュ初期胚にLQTSの原因遺伝子の一つであるKCNH2のアンチセンスモルフォリノ単独を導入したところ房室ブロックを認めた。また、野生型ヒトKCNH2 mRNAを同時に注入したところ房室ブロックの改善が認められた。

研究成果の概要（英文）： Gene analysis showed mutations were found in 27 out of 90 patients with long QT syndrome, 7 out of 58 patients with inherited bradyarrhythmia, 8 out of 90 patients with lone atrial fibrillation. We performed cellular electrophysiological study for detected mutations. Sixteen mutations were loss of function mutations and 2 mutations were gain of function mutations. Morpholino KCNH2 knockdown in zebrafish embryos displayed a AV block and WT hHERG RNA injection restored normal repolarization.

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：遺伝性不整脈 遺伝子変異 ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

先天性 QT 延長症候群、Brugada 症候群、家族性心房細動、先天性刺激伝導障害といった遺伝性不整脈の多くは、心筋細胞イオンチャネルの遺伝子変異によって発症することが知られている。これらの遺伝子変異は当科を含め多くの施設より報告され、さらに家族解析、変異チャネルの発現機能解析、シミュレーション解析などによる詳細な検討が行われ、遺伝性不整脈の病態、発症メカニズムは明らかにされつつある。

これまで遺伝性不整脈疾患の発現機能解析の中心は、哺乳類動物培養細胞などに変異チャネルを発現させ、その発現電流をパッチクランプ法で検討するものであった。また、細胞電気生理の結果をもとにシミュレーション解析を行い、遺伝子変異によるイオンチャネルの機能異常が心筋活動電位に及ぼす変化について推定を行ってきた。しかしながら、従来の機能解析の結果と実際の臨床病型と必ずしも一致しないことがあり、また、未だ明らかにされていない病態メカニズムが数多く存在する。そこで、不整脈発生の正確なメカニズムを明らかにするためには、遺伝子変異による心筋活動電位の変化や心電図異常を *in vivo* で評価することが重要と考えられる。

最近、遺伝性不整脈の *in vivo* の機能解析として、ゼブラフィッシュを利用した報告が散見されるようになった。ゼブラフィッシュはヒト遺伝子のオースログを多く保有し、その心臓電気生理学的特徴はヒトのそれと非常に類似しており、QT 延長症候群のモデルとして有用と報告されている。また、ゼブラフィッシュは飼育が容易でコストが安く、発生速度が速いことなどより、発現実験結果を短期間で得られるという利点もある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、

(1) 遺伝性不整脈疾患 (QT 延長症候群、Brugada 症候群、徐脈性不整脈、孤立性心房細動) 患者に対して遺伝子解析を行い、遺伝子変異を同定すること、(2) 変異遺伝子に対して従来の機能解析 (哺乳動物培養細胞を用いた細胞電気生理学的検討、およびシミュレーション解析) を行うこと、(3) 遺伝子変異を導入した不整脈ゼブラフィッシュ初期胚の心房筋および心室筋の活動電位測定、心電図測定を行い、(2) の解析結果とあわせて不整脈発生のメカニズムを明らかにすること、である

3. 研究の方法

(1) 遺伝性不整脈症例のサンプル収集

当科の関連病院を中心に QT 延長症候群、Brugada 症候群、若年発症 (60 歳未満) の心房細動、若年発症 (60 歳未満) および家族性徐脈の genome DNA および臨床データを集積した。

(2) 遺伝性不整脈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

集積した不整脈患者に対して、その原因遺伝子を包括的に検索し同定した。genome DNA より標的とする遺伝子のエクソンを PCR 法にて増幅し、SSCP 法、または Hi-Res Melting 法による遺伝子変異解析装置 LightScanner (Idaho Technology 社) で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。KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNE2, SCN1B, HCN4, KCNJ2, KCNA5, GJA5 など、心筋イオンチャネルをコードする遺伝子を中心に検索した。

(3) 同定された遺伝子変異の実験モデルによる機能解析

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。変異 cDNA を作成し、CHO-K1 細胞に変異を発現させ、パッチクランプ法にて変異チャネルの電気生理学的な特徴を検討した。

心室筋細胞もしくは洞結節細胞の数学的モデルを用い、チャネル遺伝子変異による膜電流変化が心筋再分極や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。

(4) ゼブラフィッシュを用いた機能解析

LQTS 症例で認められる遺伝子変異の 50% を占める KCNH2 遺伝子 (I_{Kr}) 変異の病的意義について、ゼブラフィッシュ初期胚に KCNH2 のアンチセンスモルフォリノ単独、あるいは遺伝子変異を導入したヒト KCNH2 cRNA を同時に注入し 48 時間後に不整脈評価を行った。光学顕微鏡 (Leica M205 FA, AF6000 システム) 下に心房と心室の拍動を観察して房室ブロックの有無、心停止の有無を評価した。また、ゼブラフィッシュ (2 ~ 3 dpf) の体表面心電図を測定し、不整脈、HR, PR, QRS, QT 等の評価を行った。光学顕微鏡 (OLYMPUS SZX16) 下に、トリカイン麻酔下のゼブラフィッシュ心房心室境界付近にガラス微小電極を置いた。その電気的活動を DAM80 (WPI) を用いて増幅し、アナログ-デジタル変換 (Power Lab; ADI instruments) を行い、LabChart (ADI instruments) で記録した。

4. 研究成果

(1) 遺伝性不整脈症例のサンプル収集

当科の関連病院を中心に、QT 延長症候群 261 人、Brugada 症候群 136 人、若年発症 (60 歳未満) および家族性徐脈 58 人、孤立性心房細動 90 人の発端者を集積した。

(2) 遺伝性不整脈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

(2-1) QT 延長症候群

発端者 261 人のうち、Schwartz の診断基準で LQTS スコア 4 点以上 (確実) の症例は 30 人、1.5 点以上 4 点未満 (疑い) の症例は 60 人であった。発端者 261 人に対し、KCNQ1,

KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNE2, KCNJ2, ANKB について遺伝子解析を行ったところ、LQTS 確実症例(スコア 4 点以上)30 人中 21 人(70%)、疑い症例 60 人中 6 人(10%)で遺伝子変異を認めた。遺伝子変異の種類は 30 種類で、KCNQ1 10 種類、KCNH2 15 種類、SCN5A 4 種類、ANKB 1 種類であった(表 1)。LQT1-3 の保因者の臨床的特徴を比較すると安静時 QTc は LQT3 で最も延長し、LQT1 の延長の程度は軽度であった。失神/心停止は LQT2 で最も多く認められた。

表1. LQTSの遺伝子解析結果と臨床的特徴

遺伝型	LQT1	LQT2	LQT3	LQT4
遺伝子	KCNQ1	KCNH2	SCN5A	ANKB
遺伝子変異数	10	15	4	1
保因者数	37	33	6	1
年齢(才)	29	35	18	65
心拍数(/分)	68	69	61	
安静時QTc(ms)	453	485	503	475
失神/心停止(%)	8 (22)	12 (36)	1 (17)	0

(2-2) Brugada 症候群

SCN5A の遺伝子変異の有無を解析し、3 症例で変異を認めた。

(2-3) 若年発症および家族性徐脈

発端者 58 症例に対して KCNH2, KCNA5, SCN5A, SCN1B, HCN4, KCNJ2, KCNJ3, KCNJ5, GJA5, EMD, LMNA の遺伝子解析を行い、7 症例(12%)において 7 種類の遺伝子変異を同定した(表 2)。遺伝子変異を認めた症例の特徴として、徐脈以外に QT 延長、筋ジストロフィ、心房細動などの疾患を同時に合併していることが特徴的であった。

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	p. R269W
						SCN5A	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, エミードレイブス筋ジストロフィ

(2-4) 孤立性心房細動

孤立性心房細動 90 例(平均発症年齢 47 歳、男性 66 人、家族歴 26 人)に対して KCNQ1, KCNH2, KCNE1, KCNE2, KCNJ2, KCNA5, SCN5A, SCN1B, SCN2B, SCN3B, GJA5, NPPA の遺伝子解析を行い、7 種類の遺伝子変異を 8 症例(9%)に認めた(表 3)。なお、心房細動の家族歴を認めた 26 症例中上記の遺伝子変異を認めた症例は 3 症例であった。このことは上記遺伝子以外の原因遺伝子が存在することが示唆される。

表3. 孤立性心房細動の遺伝子解析結果と臨床的特徴

Patient No	Genotype	Gender	Family history	Phenotype	Onset, y	ECG	Catheter ablation
1	KCNA5 H463R	F	No	Persistent	51	QTc 0.452	Yes
2	KCNA5 T527M	M	Yes	Persistent	49	QTc 0.391	No
3	KCNQ1 1442-1443 del ACCTGG	M	No	Paroxysmal	41	QTc 0.39	No
4	KCNH2 T436M	M	Yes	Chronic	38	QTc 0.371	No
5	KCNH2 T895M	M	Yes	Persistent	40	QTc 0.405	Yes
6	SCN5A R986Q	M	No	Paroxysmal	58	QTc 0.369	No
7	SCN1B T189M (Homozygous)	F	No	Paroxysmal	59	QTc 0.378	No
8	SCN1B T189M (Heterozygous)	F	No	Paroxysmal	55	QTc 0.420	No

(3) 同定された遺伝子変異の実験モデルによる機能解析

(3-1) QT 延長症候群

同定された遺伝子変異のうち、4 種類の KCNQ1 遺伝子変異、8 種類の KCNH2 遺伝子変異について、パッチクランプ法を用いて細胞電気生理学的検討を行った。程度に違いは認められたものの、変異チャネルの発現電流の低下を認めた。そのなかでも、著しい発現電流の低下を示した KCNQ1 S277L, KCNH2 T473P, KCNH2 N633I, KCNH2 E637K の変異をもつ症例には有意に失神発作を認めた。

表4 機能解析を行った主な遺伝子変異と臨床像

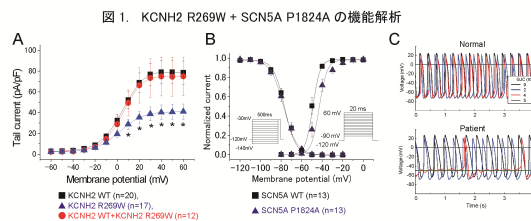
遺伝子変異	変異部位	保因者数	失神 orTdP	平均 QTc	β 遮断薬	ICD	機能異常	DN抑制
KCNQ1								
F193L	S2-S3	4	0	415	0	0	低下	なし
S277L	S5	9	3	466	2	1	低下	あり
R591H	C-term	3	0	477	0	0	低下	なし
D611Y	C-term	11	0	416	0	0	低下	なし
KCNH2								
M124T	N-term	6	2	485	2	0	低下	なし
R176fsX331	N-term	1	1	453	0	0	低下	なし
G183fsX198	N-term	1	0	479	0	0	低下	なし
T473P	S2-S3	2	2	488	2	1	低下	あり
H492Y	S2-S3	1	1	472	0	0	低下	なし
R534C	S4	4	1	481	1	0	低下	なし
N633I	pore	3	2	462	1	0	低下	あり
E637K	pore-S6	3	2	482	2	0	低下	あり

DN抑制, dominant negative suppression

KCNH2 T473P に対してウェスタンブロット解析を行ったところ、本変異では完全糖鎖付加型のタンパク質の発現が見られず、膜移送障害が起こっていると考えられた。

(3-2) 若年発症および家族性徐脈

2 つの遺伝子変異を認めた KCNH2 R269W + SCN5A P1824A に対してパッチクランプ法による検討を行った。両変異とも機能喪失型変異であった。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。



(3-3) 孤立性心房細動

同定された遺伝子変異のうち、2 種類の *KCN5A* 遺伝子変異、2 種類の *KCNH2* 遺伝子変異、1 種類の *SCN5A* 遺伝子変異、1 種類の *SCN1B* 遺伝子変異について、パッチクランプ法を用いて細胞電気生理学的検討を行った。*KCN5A* 遺伝子変異のうち、*H463R* 変異において発現電流の消失が認められた。2 種類の *KCNH2* 変異はいずれも発現電流の増大が認められた。*SCN5A* 変異は機能低下変異、*SCN1B* 変異は機能亢進変異と考えられた (表 5)。

表5 機能解析結果

Genotype	Location	Current density	Channel kinetics
<i>KCN5A</i> H463R	S5-Pore	Absent I_{Kur}	No change
<i>KCN5A</i> T527M	C-terminus	No change	No change
<i>KCNH2</i> T436M	S1-S2 linker	Increased peak currents	Slower deactivation
<i>KCNH2</i> T895M	C-terminus	Increased peak and tail currents	Slower deactivation
<i>SCN5A</i> R986Q	DII-DIII linker	Decreased peak current	No change
<i>SCN1B</i> T189M	C-terminus	Increased peak currents	Negative shift in steady-state activation

KCN5A H463R および *SCN1B* T189M 変異は異所性興奮により、*KCNH2* 機能亢進変異および *SCN5A* 機能低下変異は機能的リエントリーが心房細動発症に関与していると考えられた (表 6)。

表6 機能解析結果と臨床像

Genotype	Phenotype/QTc (s)	Function	Presumed mechanisms	Reported studies
<i>KCN5A</i> H463R	Persistent 0.452	Loss	Ectopic activity	Novel
<i>KCN5A</i> T527M	Persistent 0.391	No change	Unknown	Familial AF
<i>KCNH2</i> T436M	Chronic 0.371	Gain	Functional reentry substrate	LQTS
<i>KCNH2</i> T895M	Persistent 0.405	Gain	Functional reentry substrate	SIDS
<i>SCN5A</i> R986Q	Paroxysmal 0.369	Loss	Functional reentry substrate	Novel
<i>SCN1B</i> T189M	Paroxysmal 0.378	Gain	Ectopic activity	Novel

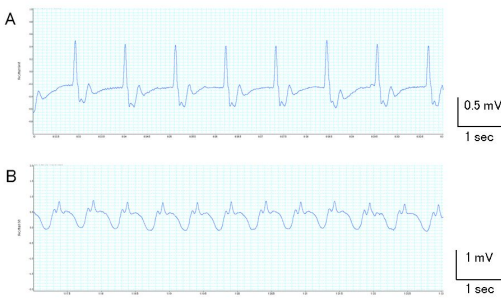
(4) ゼブラフィッシュを用いた機能解析

ゼブラフィッシュ初期胚に *KCNH2* のアンチセンスモルフォリノ単独を導入したところ、90%以上で房室ブロックあるいは心停止が生じたことを光学顕微鏡下に確認した。一方、モルフォリノと野生型ヒト *KCNH2* mRNA を同時に注入したところ、60%以上が正常を示した。

ゼブラフィッシュ (受精後 2-3 日) の電気的活動を評価を行ったところ、図 2 のように

P, QRS, T 波を確認できる心電図が記録された。心拍数はヒトに近い拍数と考えられた。

図2 ゼブラフィッシュ心電図



(5) まとめ

QT 延長症候群と診断あるいは疑われた 90 症例中 27 症例 (30%) に、若年発症 (60 歳未満) および家族性徐脈 58 症例中 7 症例 (12%) に、孤立性心房細動 90 症例 8 症例 (9%) に遺伝子変異が認められた。

同定された遺伝子変異に対してパッチクランプ法、シミュレーション解析などを行った。機能解析を行いえた遺伝子変異のうち、LQTS で同定された 12 遺伝子変異はすべて機能喪失変異、若年発症の徐脈の変異は機能喪失変異、孤立性心房細動の 6 変異のうち 3 変異は機能亢進、2 変異は機能喪失、1 変異は機能変化なしであった。

ゼブラフィッシュ初期胚に *KCNH2* のアンチセンスモルフォリノ単独を導入したところ房室ブロックあるいは心停止を認め、野生型ヒト *KCNH2* mRNA を同時に注入したところ正常を示した。ゼブラフィッシュ受精後 2-3 日の心電図を測定した

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 6 件)

1. Hayashi K, Konno T, (他 4 名, 2, 3 番目). Current perspectives in genetic cardiovascular disorders: from basic to clinical aspects. Heart Vessels. 2014 Mar;29(2):129-41. 査読有
2. Konno T, Hayashi K, (他 16 名 14, 15 番目). Sarcomere gene mutations are associated with increased cardiovascular events in left ventricular hypertrophy: results from multicenter registration in Japan. JACC Heart Fail. 2013 Dec;1(6):459-66. doi: 10.1016/j.jchf.2013.08.007. 査読有
3. Hayashi K, Konno T, (他 13 名, 2, 7 番目). A novel mutation in the transmembrane nonpore region of the *KCNH2* gene causes severe clinical manifestations of long QT syndrome. Heart Rhythm. 2013 Jan;10(1):61-7. doi: 10.1016/j.hrthm.2012.09.053 査読有

4. Konno T, Hayashi K, (他 8 名, 6,7 番目). Gene and protein expression analysis of mesenchymal stem cells derived from rat adipose tissue and bone marrow. *Circ J*. 2011 Aug 25;75(9):2260-8. 査読有
5. Gamou T, Hayashi K, (他 3 名, 1, 4 番目). [Invasive diagnostic imaging of coronary atherosclerosis]. *Nihon Rinsho*. 2011 Jan;69(1):69-73. 査読無
6. Hayashi K, Konno T, (他 15 名, 1, 6 番目) *KCR1* Variant Implicated in Susceptibility to the Long QT Syndrome *J Mol Cell Cardiol*. 2011 Jan;50(1):50-7. 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

Hayashi K, Konno T, Mechanisms of fever-induced QT prolongation in a patient with a *KCNH2* G584S mutation The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society Featured research session 16 2014 年 3 月 22 日 東京国際フォーラム (東京)

Hayashi K, Konno T, Impact of New LQTS Diagnostic Criteria on Detection of Long QT Syndrome with Carrying Gene Mutations American Heart Association SCIENTIFIC SESSIONS 2013 Nov. 16-20, 2013, Dallas Convention Center (USA)

林 研至 臨床心臓病 up to date ~ 突然死症候群の臨床: 予知と予防の最前線 ~ 第 61 回日本心臓病学会学術集会 教育講演 2013 年 9 月 20 日 ~ 22 日 パレア (熊本)

Hayashi K, Konno T, Impact of New LQTS Diagnostic Criteria on Detection of Long QT Syndrome with Carrying Gene Mutations, The 28th Annual Meeting of the Japanese Heart Rhythm Society グランドプリンスホテル新高輪 2013 年 7 月 4 日 ~ 6 日 (東京)

林 研至, 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)

Hayashi K, Konno T, 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)

林 研至 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)

林 研至 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)

林 研至 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)

Hayashi K, Konno T, 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)

Hayashi K, Konno T, 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)

〔図書〕(計 2 件)

林 研至 家族性心房細動 最新医学 68:1626-1634, 2013 最新医学社

林 研至 QT 延長症候群の遺伝子診断に基づく発症機序の解明 循環器科 70:446-454, 2011 科学評論社

〔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

蒲生 忠継 (GAMOU TADATSUGU)

金沢大学・大学病院・医員

研究者番号: 10579634

(2) 研究分担者

林 研至 (HAYASHI KENSHI)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号: 0042642

今野 哲雄 (KONNO TETSUO)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号: 50377389

(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