

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390209

研究課題名(和文) 遺伝性不整脈発症の分子基盤に関する統合的研究

研究課題名(英文) Multidisciplinary Studies on Molecular Pathogenesis of Inherited Primary Arrhythmia Syndromes

研究代表者

堀江 稔(Horie, Minoru)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：90183938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：我々は1996年より、不整脈疾患を中心に、遺伝性循環器疾患の臨床情報とゲノムDNAを集積しており、現在、3500名近い症例(~1700家系)について詳細な病像をもとにゲノム解析を行っている。その遺伝子異常同定率は遺伝性QT延長症候群では5割強、ブルガダ症候群では1割程度であるが、発見されたすべての遺伝子異常が、実は病気の発症と結びついているわけではない。本研究課題では、遺伝子異常に関して多方面からの機能解析やコンピュータシミュレーション法を用いて、個々の遺伝子変異が果たして病態とどのように関連するかを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Since 1996, we have collected both detailed clinical data and genome from patients with cardiovascular problems, especially with inherited primary arrhythmia syndromes (IPAS). We have registered ~3,500 cases (~1,700 families) and conducted genetic testing. As to probands with congenital long QT syndrome, more than half of them could be identified, as to those with Brugada syndrome, ~10% was identified to have SCN5A mutations. However, all the identified genetic variants were not necessarily pathogenic. Based on multidisciplinary approaches, including functional assay of mutant channels by patch-clamp method or computer simulation technique, we could evaluate the genotype-phenotype relation in regard to IPAS.

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

キーワード：分子心臓病態学

1. 研究開始当初の背景

遺伝性不整脈は、禁煙、ヒト・ゲノム・プロジェクトをはじめとする分子遺伝学の急速な進歩により明らかとされた比較的新しい疾患概念である。すなわち、心筋イオンチャネルあるいはその関連蛋白の遺伝子における多種多様な変異により招来されるチャネル病であることが判明した。

2. 研究の目的

(1) 我々は1996年(最初のQT延長症候群関連遺伝子が報告された翌年)から、倫理委員会の承認を受け、患者さんよりインフォームド・コンセントを得て、臨床像とゲノムDNAの集積を行っている。たとえば、QT延長症候群に関しては、現時点で、310名の発端者および293名の家族で遺伝子異常が判明している。このコホートの大きさは海外の研究チームでの症例数と比べても遜色なく、この日本人コホートを用いて、我々に特有な循環器疾患の遺伝的背景さらにその発症メカニズムを、多面的に探求することが、本研究課題の目的である。発見された多種多様な遺伝子異常(変異のみならず単一塩基多型, SNP, も含む)が招来する機能的な変化を検討するため、具体的には、遺伝子組み換え法による変異株の作成、

転写機構に及ぼす影響を見るための分子遺伝学的アプローチ(minigene, RT-PCRなど)、

チャネルあるいはその調節蛋白の細胞内輸送を見るためのイメージング法(GFP taggingや免疫染色法) チャネルあるいはその調節蛋白の異常を起こす電気生理学的な変化を見るためのパッチクランプ法、ヒト細胞モデルとしての疾患特異的iPSの作成、さらにそれらを統合的に解析するためのコンピュータシミュレーション法などを駆使する。

(2) 研究期間内に何をどこまで明らかにするのか?(平成23年度) 上述のように、たとえばQT延長症候群症例で310家系に既知の遺伝子の異常を同定しているが、これらのゲノム

DNA上の異常が、すべて病気の発症と結びつくわけではない。個々の遺伝子レベルの異常がどのように病態と結びつくのかは、地道な機能解析による検討が必要である。従来行われてきた、研究の王道は、遺伝子組み換え法により変異株を作成し、適当な培養細胞系にこれを導入し、その細胞が合成する目的の蛋白の機能を見るものであったが、この方法では必ずしも実際にヒトで起こっている現象を忠実に反映していないことが分かってきた。たとえば、培養細胞に蛋白発現させるため、現実にはあり得ない強力なプロモーターを用いるため、転写レベルでの種々の問題を明らかにすることができない。本研究課題では、このような従来の方法では解明できない病気発症メカニズムについて、遺伝性不整脈症例において、我々が集積した遺伝情報を用いて検討したい。

(3) 研究の特色・独創的な点 遺伝的な因子が多く疾患の発症に関与しているが、その詳しい発症メカニズムを申請者らが同定しえた多数の遺伝子異常をモデルとして多面的に解明しようとする点、さらに臨床像ひいては遺伝性不整脈の治療にせまることができる点、特色ある研究と考える。

3. 研究の方法

基本的な方法論として、遺伝子組み換え法による変異株の作成、分子遺伝学的アプローチ(minigene, RT-PCRなど)、チャネルあるいはその調節蛋白の細胞内輸送を見るための光センサー・イメージング(GFP taggingや免疫染色法) 電気生理学的な変化を見るためのパッチクランプ法、ヒト細胞モデルとしての疾患特異的iPSの作成、得られたデータを統合的に解析するためのコンピュータシミュレーションを多面的に活用する。おのこの領域で申請者らは十分な実績を有している。

(1) Pre-translation regulation: RNA

science)に関する検討

Exonic Splicing Enhancer (ESE)などの遺伝子変異の同定 (平成23年度)

遺伝性不整脈患者のゲノムDNA 検索で同定できた変異についてESE上にある可能性のものを抽出し、SR蛋白の結合率を減少させるかどうかを検討する。さらに、イントロン内のスプライシング抑制あるいは促進領域の異常も検出する。このためには、新たにイントロン領域検索のためのプライマーを作成する。大量のサンプルを処理するためDHPLCを用いたマススクリーニングを行う。さらに、スプライシング予想配列以外の領域における関連変異の検出を試みる。RNA安定採血管(Paxgene)を用いて患者血液を採血し、抽出されたmRNAをRT-PCRすることによりスプライシング異常の有無を調べる。イントロン領域での発見はスプライシング様式と病態との関連で新たな知見をもたらす。(担当:堀江、研究協力者:辻敬子・大学院生)

異常splicing検出のための minigene実験 (平成23年度)

疾患発症に関わる可能性の変異を含むエクソンとその近傍のイントロンをPCR増幅し、これをエクソン・トラップ・ベクターに組み込む。これらの変異プラスミドを培養細胞に導入する。用いる細胞によるスプライシング様式の変化を考慮し、数種類の培養細胞を用いる予定である。RNAを抽出してRT-PCRを行い、mRNAの発現パターンを調べる。スプライシング・パターンに変化が見られた場合、それらのmRNAの定量を行う。その際、リアルタイムPCR法を用いる。(担当:堀江、研究協力者:辻敬子・大学院生)

Nonsense Mediated Decay of mRNA検出のための minigene 実験 (平成24-25年度)

スプライシングの異常は、結果的に、exon skippingを起こして、短いmRNAを作ることになる。必然的にDNA情報のframe shift が起こり、ためにstop codon が下流に入り、

nonsense mutationとなる。生物には、このような短いmRNAからの翻訳を行わないで、それを分解してしまうNonsense Mediated Decay of mRNA (NMD)という、いわば製品管理のシステムがあり、これが臨床像を大きく左右することが知られている(たとえば、遺伝性筋ジストロフィーのDuchenne型とBecker型の違い)。そこで、具体的には、minigene実験を行う。哺乳類発現ベクターをつけた数エクソン・イントロン配列を、患者ゲノムDNAより分離して、これを培養細胞に導入して、スプライシングを行わせる。翻訳を抑制して、RNAのみを抽出し、RT-PCRを行うことにより、異常スプライシングの結果、作られたmRNAがNMDを受けると、そのmRNAは検出されなくなる。この方法でNMDの関与調べる。(担当:堀江、研究協力者:辻敬子・大学院生)

(2) Post-translation regulation: Protein science)に関する検討

蛋白の翻訳後、発生する異常のために、疾患を発症するメカニズムについて検討する。Pre-translational regulationの研究と同時に、かつ緊密に連携しながら行う。疾患特異的iPS細胞・心因細胞への分化誘導(平成23年度)

インフォームド・コンセントを取り遺伝性不整脈症例の皮膚あるいは血液組織からiPS細胞を作製し、組織学的、分子生物学的、電気生理学的手法を駆使して病態発症メカニズムの解明を目指す。まず、線維芽細胞に分化(所要期間4-6週)させた後、線維芽細胞にレンチウイルスでエクトロピックレトロウイルスの受容体(Slc7a1)を導入。4 遺伝子(c-Myc, Oct3/4, SOX2, Klf4)をエクトロピックレトロウイルスベクターにて導入する。マイトマイシン処理したMEF またはSTO 培地フィーダー上で、bFGF(basic fibroblast growth factor)入りヒトES細胞培養液にて3-4週間培養を続けることにより、iPS細胞コロニーが形成される。(Takahashi et al. Cell 2007)

iPS 細胞の確認として、免疫染色、RT-PCT法にて未分化マーカー (Oct3/4, Nanog, SSEA3, SSEA4) の発現を確認する。また、SCID (免疫不全) マウスの精巣にiPS 細胞を移植し、teratoma が形成されることを確認する。導入することにより、iPS細胞を作製する。マトリゲル上にiPS 細胞を播き、activin A と BMP4(bone morphogenetic protein 4) を加え培養することにより、心筋細胞へ分化誘導する。通常2 週間ほどで、自動能を有するiPS 細胞由来心筋細胞クラスターが形成される。(Laflamme et al. Nat. Biotechnol 2007)

免疫組織学的解析 (平成23 年度)

遺伝性不整脈で特異な心筋症を合併する不整脈源性右室心筋症は、デスモゾーム関連分子に、5 つの新しい遺伝子異常が発見されている。そのうち一つのplakoglobin 抗体に対する免疫染色のレベルが心筋生検の組織学的検討で低下あるいは消失することが示されたが、疾患特異的なiPS 細胞由来心筋細胞を用いることにより、侵襲的な心筋生検をすることなく、診断をすることができる可能性がある。さらに、この方法で診断できない家族性心筋症例では、電子顕微鏡による形態観察も加えて、原因蛋白の同定を行う。健常および疾患特異的なiPS 細胞由来心筋細胞から各種遺伝子や転写因子などの定量化を行うことにより、エピジェネティックな変化の解析や転写因子・遺伝子の発現をRNA、蛋白レベルの両方で定量し評価する。この方法により候補遺伝子を推定する。同時に膨大な数の遺伝子情報を健常Control心筋細胞から得られる結果と比較検討するため、DNA Chip を使用する。

光センサーを用いたイメージング(平成23 年度)

変異体に機能変化が見られた場合、その原因を追究するために変異チャンネルの細胞内局在の様子を明らかにする。日本人が発見しノーベル賞を受賞したことで有名な蛍光タンパクであるGFPを用いて、共焦点顕微鏡による観察

を行う。チャンネル変異体と蛍光タンパクを融合させ、培養細胞に発現させ、細胞内での局在を調べる。また、FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)法を用いて、蛋白間の結合状態も観察する。この解析膜に発現しているタンパクを正確に検出できるピオチン・アッセイも行う。また、細胞内のCa ハンドリングの変化が、不整脈発症に先行することが知られているので、Ca 感受性光センサー・イメージ法を用いて、細胞内Ca レベルを可視化して、病態との関連を調べる。(担当：堀江、連携協力者：Wu)

(研究計画：平成24年度以降)

電気生理学的な変化を見るためのパッチクランプ法

我々が、機能解析で従来用いてきた遺伝子組み換え法で作成した変異遺伝子を培養細胞に導入する方法に加えて、健常および疾患特異的なiPS 細胞由来心筋細胞も、酵素で単離することによりパッチクランプ法に供する。これにより個々のイオンチャンネルの活性のみならず、活動電位や各イオンチャンネル電流変化を詳細に検討する。また、iPS 細胞の場合、自動能を呈する拍動cell ball の状態で多点平面電極システム(multiple electrode array mapping: MEA)を用いて、多細胞の疑似活動電位を測定し、QT 延長症候群の病像との相関を検討する。(担当：伊藤、連携協力者・Wu)

コンピュータシミュレーションを多面的に活用したシステムバイオロジーへの展開生命体としてのヒトの中では、上記のような多様な方法で観察された生理あるいは病的現象は、ひとつのシステムとして働いている。これらを統合的に解析するには、コンピュータが絶大な威力を発揮する。分担研究者の芦原は、当該分野の専門家であり、とくに不整脈のバイドメイン・モデルを用いたシミュレーションに多くの経験と実績を有している。実験で得られたデータは、綿密に検討され、コンピュータ・モデルに組み込み、疾患発症との関

連を、個々の状況で検討できる。(担当:堀江、芦原)

4. 研究成果

(1) 昨年度は日本で初めて、多数例でのカテコラミン感受性多形性心室頻拍と不整脈源性右室心筋症で関連遺伝子の検索を行い報告した。発見された遺伝子変異について培養細胞を用いたパッチクランプ法や蛋白イメージング法を用いて機能解析を行った。さらにコンピュータシミュレーション法で、機能障害が病態とどのように関連するか調べた。また、遺伝性 QT 延長症候群症例から得られた iPS 細胞を心筋に分化することによって、個々の遺伝性背景を保持した心筋細胞を作成し機能解析をおこなった。これまでの業績を評価され、Circulation Research 誌から K チャネルと遺伝性不整脈に関する総説の依頼を受け執筆した。

(2) 1996 年より集積している遺伝性不整脈症例の詳細な臨床所見と遺伝子検索で得られた遺伝型との比較検討を行った。QT 延長症候群の LQT1 は、運動時に QT 延長が増強し発症する例があるため、遺伝子型との関連を調べたところ、KCNQ1-G269S のキャリアで、運動負荷に対する QT 時間の反応が、著しく増強していることを発見した。遺伝子組み換え法と培養細胞を用いたパッチクランプ法により、この KCNQ1-G269S 変異が再構築する遅延整流カリウム電流は WT に比べて、減少していること (Loss-of-function mutation)、運動に伴い活性化するプロテインキナーゼ A による修飾を受けないことが判明した。新しいメカニズムによる QT 延長症候群の病態を解明した。Brugada 症候群は、心臓性突然死を起こす重篤な病気であるが、その分子基盤はナトリウムチャネル遺伝子の変異だけでは、十分説明できていなかった。国際共同研究で、本症候群のゲノムの GWAS を行い、新たな修飾因子として HEY2 と SCN10A 遺伝子

を発見し、Nature Genetics 誌に発表した。カテコラミン感受性多形性心室頻拍 (CPVT) は、小児発症の運動に伴う重症不整脈で、非常に死亡率の高い病気であるが、その遺伝的背景や日本での頻度など不明な点が多かった。我々は、3 つの CPVT 関連遺伝子 (RyR2, CASQ2, KCNJ2) について、50 人の臨床診断された発端者で検討した。実に、56% に RyR2 変異が同定された。また、非常に頻度が低いとされる CASQ2 と KCNJ2 の変異例も一例ずつ発見し、まとめて報告した。QT 延長症候群のうち、LQT7 とされる Andersen 症候群は、周期性四肢麻痺と骨格異常を伴う病気であるが、そのモザイク症例を同定し、家族内の検討も含めて、モザイクの程度を TA クローニングと次世代シーケンサ (NGS) を用いて決定した (Hasegawa et al, in press)。この報告は、NGS の新規の利用方法を提示するものでもあった。QT 延長症候群のうち、LQT8 はカルシウムチャネル関連遺伝子の変異により、発症するが、自閉症や骨格異常を伴う Timothy 症候群とはことなり、QT 延長のみを示す患者群にも、カルシウム遺伝子異常があることを初めて報告した。

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 40 件)

Bezzina CR, Horie H. (63 名中 28 番目)
Common variants at
SCN5A-SCN10A and HEY2 are
associated with Brugada syndrome, a
rare disease with high risk of sudden
cardiac death. *Nature Genetics* 45(9):
1044-9, 2013. DOI:10.1038/ng.2712 査
読有

Itoh H, Horie M. (8 名中 5 番目)
Age-dependent clinical and genetic

characteristics in Japanese patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Circulation Journal* 77(6): 1534-1542, 2013.DOI:10.1253/circj.CJ-12-1446 査読有
堀江 稔、不整脈源性右室心筋症、循環器内科、査読有、Vol.73、No.4、2013、pp437-442、
<http://www.kahyo.com/category/A1-J>

〔学会発表〕(計 59 件)

Itoh H, Horie M.: Asymmetry of parental origin in Long QT syndrome. European Human Genetics Conference (2013.06.08-11, Paris, France)

Horie M.: Different regulation of IKS channels by two KCNE 1 C- terminus variants predicts the QTc response to the exercise stress. The Heart Rhythm Society's 34th Annual Scientific Sessions (2013.05.08-11, Denver, CO, U.S.A.)

Horie M.:Genetic and acquired background of fatal arrhythmias. 第 77 回日本循環器学会総会・学術集会 (2013.03.15-17 横浜)

〔図書〕(計 4 件)

堀江 稔、メディカルレビュー社、イオンチャンネル病としての心房細動、不整脈 2013、2013、8

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqmed1/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

堀江 稔 (HORIE, Minoru)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：90183938

(2)研究分担者

芦原 貴司 (ASHIHARA, Takashi)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：80396259

伊藤 英樹 (ITOH, Hideki)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：30402738

(3)連携研究者

呉 捷 (WU Jie)
西安交通大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：40595097