

## 遺伝性不整脈の日本人コホートにおける遺伝的背景と発症メカニズムの検討

堀江 稔

滋賀医科大学 内科学講座 呼吸循環器内科

### 【研究の背景】

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、循環器疾患を含め多くの疾患の遺伝的背景が明らかにされた。我々は倫理委員会の承認を受け、1996年から、患者さんよりインフォームド・コンセントを得て、遺伝性不整脈を中心に臨床像とゲノム DNA の集積を行っている。2016 年 10 月現在、4500 名以上の患者コホートを有しており、海外の研究チームと比べても遜色ない。さらに、2014 年から本格的に小型次世代シークエンサ (MiSeq, Illumina) を用いた網羅的エクソン解析を始めており、従来の Sanger シークエンス法ではカバーできなかった新規遺伝子の変異を次々と発見している。1996 年より集積した遺伝性循環器疾患に対して、遺伝子検索を行い発見できた変異について機能解析を行い、その発症のメカニズムに迫る多くの研究を行ってきた。

### 【目的】

本研究課題では、我々の遺伝性不整脈患者コホートを用いて、日本人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目的である。

### 【方 法】

MiSeq を駆使して、表現型の有無による家族内ゲノムを検索することにより VUS (variant of unknown significance) を含めた多くの候補 variant を検出する。すでに利用できる SNP データベースなどの既存の遺伝子情報などの bioinformatics を利用して病原性を持つと考えられる variant を同定する。疾患の関係から、variant をもつ遺伝子はイオンチャネルあるいはその調節蛋白をコードしていることが多い。この場合、遺伝子組み換え法で作成した変異株を培養細胞に導入する方法で、電気生理学的な特性を検討する。従来、我々が行ってきたスタンダードな手法である。これに加えて、健常人由来、および疾患特異的な iPS 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とができる。これにより個々のイオンチャネルの活性のみならず、活動電位や各イオンチャネル電流変化を詳細に検討する。

### 【結 果】

今回、細胞内 Ca ハンドリングの異常を来す筋小胞体の Ca 遊離チャネルであるリアノジン遺伝子の変異について、MiSeq を用いた panel gene sequencing 法で我々のコホートから、症例をまず抽出して検討した。その結果、リアノジンは従来 CPVT (カテコラミン誘発性多形性心室頻拍) の原因であることが、知られていたが、その他の多くの不整脈の原因である可能性が示唆された。臨床的に CPVT を強く疑われている 149 名の発端者では、115 名にリアノジン遺伝子 (RyR2) の変異が同定された。また、panel sequencing で、臨床的に short coupled torsade de pointes 症例 7 例を検索したところ、そのうち 4 例に RyR2 遺伝子の変異が同定された。これらの変異については、遺伝子組み換え法で作成した変異株を培養細胞に導入する方法で、細胞内 Ca ハンドリンの特性を検討した。興味深いことに、そのうち一つの変異 (Ser4938Phe) については、強力な loss-of-function を示した。この研究は、ごく最近 Heart Rhythm 誌に受理された。

## 【考 察】

我々の大きなコホートで、CPVT および short coupled torsade de pointes (scTdP) 症例を対象に、panel gene sequencing 法で、主として RyR2 遺伝子の variant を検索したところ、従来、その疾患の molecular basis が、良くわかつていなかつた scTdP についても、リアノジン蛋白の機能異常(それも、強い loss-of-function)が関与している可能性が証明された。これは、世界に先駆けての新しい報告となった。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

比較的頻度の低い CPVT あるいは scTdP という疾患群であるが、その不整脈の本体として L 型カルシウムチャネルと筋小胞体を中心とした細胞内 Ca ハンドリングの異常があることが、この一連の研究からうかがわれる。いわゆる細胞内 Ca レベルの増加による、delayed afterdepolarization あるいはプルキンエ不整脈の病態解明と治療法に直接つながる研究成果である。

## 【参考・引用文献】

1. Ichikawa M, Ohno S, Fujii Y, Ozawa J, Sonoda K, Fukuyama M, Kato K, Kimura H, Itoh H, Hayashi H, Horie M. Multigenerational Inheritance of Long QT Syndrome Type 2 in a Japanese Family. Internal Med. 55: 259-262. 2016
2. Chen J, Makiyama T, Wuriyanghai Y, Ohno S, Sasaki K, Hayano M, Harita T, Nishiuchi S, Yamamoto Y, Ueyama T, Shimizu A, Horie M, Kimura T. Cardiac Sodium Channel Mutation Associated with Epinephrine-Induced QT Prolongation and Sinus Node Dysfunction. Heart Rhythm. 13:289-298. 2016
3. Ueshima H, Kadowaki T, Fujiyoshi A, Miura K, Ohkubo T, Kadota A, Kadowaki S, Nakamura Y, Miyagawa N, Okamura T, Kita Y, Takashima N, Kashiwagi A, Maegawa H, Horie M, Yamamoto T, Kimura T, Kita T, for the ACCESS and SESSA Research Group. Lipoprotein-associated phospholipase A2 related to the risk of subclinical atherosclerosis independent of small low density lipoprotein particles in a general Japanese population. Submitted to Athelosclerosis. 246: 141-147. 2016
4. Kaitani K, Inoue k, Kobori A, Nakazawa Y, Ozawa T, Kurotobi Toshiya, Morishima I, Miura F, Watanabe T, Masuda M, Naito M, Fujimoto H, Nishida T, Furukawa Y, Shirayama T, Tanaka M, Okajima K, Yao T, Egami Y, Satomi K, Noda T, Miyamoto K, Haruna T, Kawaji T, Yoshizawa T, Toyota T, Yahata M, Nakai K, Sugiyama H, Higashi Y, Ito M, Horie M, Kusano K, Shimizu W, Kamakura S, Morimoto T, Kimura T, on behalf of the EAST-AF Trial Investigators:Efficacy of Antiarrhythmic drugs Short-Term use after catheter ablation for Atrial Fibrillation (EAST-AF) trial. European Heart Journal.37: 610-618. 2016
5. Wada Y, Aiba T, Tsujita Y, Itoh H, Wada M, Nakajima I, Ishibashi K, Okamura H, Miyamoto K, Noda T, Sugano Y, Kanzaki, Toshihisa Anzai, Kengo Kusano H, Yasuda S, Horie M, Ogawa H. Practical Applicability of Landiolol, an Ultra-short-acting  $\beta$ 1-selective Blocker, for Rapid Atrial and Ventricular Tachyarrhythmias with Left Ventricular Dysfunction. Journal of Arrhythmia. 82-88. 2016
6. Toyota T, Shiomi H, Taniguchi T, Morimoto T, Furukawa Y, Nakagawa Y, Horie M, Kimura T. Culprit Vessel Only Versus Staged Multivessel Percutaneous Coronary Intervention Strategies in Patients with Multivessel Coronary Artery Disease Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention for ST-segment Elevation Myocardial Infarction. Circulation Journal. 80: 371-378. 2016
7. Sonoda K, Ohno S, Otsuki S, Kato K, Fukuyama M, Yagihara N, Watanabe H, Hayashi H, Minamino T, Horie M. Quantitative analysis of PKP2 and neighbouring genes in a patient with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by heterozygous PKP2 deletion. Europace (in press)

8. Baruteau AE, Perryd JC, Sanatanie S, Horie M, Walshg EP, Dubin AM. Evaluation and management of bradycardia in neonates and children. European Journal of Pediatrics. 175: 151-161. 2016
9. Zaid M, Miura K, Fujiyoshi A, Abbott RD, Hisamatsu T, Kadota A, Arima H, Kadowaki S, Torii S, Miyagawa N, Suzuki S, Takashima N, Ohkubo T, Sekikawa A, Maegawa H, Horie M, Nakamura Y, Okamura T, Ueshima H, for the SESSA Research group. Associations of serum LDL particle concentration with carotid intima-media thickness and coronary artery calcification. Journal of Clinical Lipidology. 10:1195-1202. 2016
10. Freyermuth F, Rau F, Kokunai Y, Linke T, Sellier C, Nakamori M, Kino Y, Arandel L, Jollet A, Thibault C, Philipps M, Vicaire S, Jost B, Udd B, Day JW, Duboc D, Wahbi K, Matsumura T, Fujimura H, Mochizuki H, Deryckere F, Kimura T, Nukina N, Ishiura S, Lacroix V, Campan-Fournier A, Navratil V, Chautard E, Auboeuf D, Ashihara T, Itoh H, Horie M, Imoto K, Lee K-Y, Swanson MS, Lopez de Munain A, Burge C, Wang E, Zimmer T, Furling D, Takahashi MP, Charlet-Berguerand N: Misregulation of the alternative splicing of the cardiac sodium channel SCN5A is associated with cardiac conduction delay and heart arrhythmia in myotonic dystrophy. Nature Communications. 7:11067. 2016
11. Hayashi K, Konno T, Fujino N, Itoh H, Sakata K, Tada H, Tsuda T, Nagata Y, Teramoto R, Tanaka Y, Fujii Y, Imi-Hashida Y, Saito T, Kawashiri M, Ohta K, Horie M, Yamagishi M. Impact of Updated Diagnostic Criteria for Long QT Syndrome on Clinical Detection of Diseased Patients: Results from Study of Patients Carrying Gene Mutations. JACC Clin Electrophysiol. 2:279-287. 2016
12. Yamazoe M, Hisamatsu T, Miura K, Kadowaki S, Zaid M, Kadota A, Torii S, Miyazawa I, Fujiyoshi A, Abbott RD, Arima H, Sekikawa A, Maegawa H, Horie M, Ueshima H, for the SESSA Research Group. Relationship of insulin resistance to prevalence and progression of coronary artery calcification beyond metabolic syndrome components: Shiga Epidemiological Study of Subclinical Atherosclerosis (SESSA). Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 36:1703-1708. 2016
13. Aoki H, Nakamura T, Horie M, Ohno S, Makiyama T, Takemura T. Cardiac Conduction Defects and Brugada syndrome: A Family with Overlap Syndrome carrying a Nonsense SCN5A Mutation. Journal of Arrhythmia (in press)
14. Itoh H, Crotti L, Aiba T, Spazzolini C, Denjoy I, Fressart V, Hayashi K, Nakajima T, Ohno S, Makiyama T, Wu J, Hasegawa K, Mastantuono E, Dagradi F, Pedrizzini M, Yamagishi M, Berthet M, Murakami Y, Shimizu W, Guicheney P, Schwartz PJ, Horie M. The Genetics Underlying Acquired Long QT Syndrome. Impact on genetic screening. European Heart Journal . 37: 1456-1464. 2016
15. Nakatsuma K, Shiomi H, Morimoto T, Furukawa Y, Nakagawa Y, Ando K, Kadota K, Yamamoto T, Suwa S, Horie M, Kimura T, on behalf of the CREDO-Kyoto AMI investigators: Inter-facility Transfer versus Direct Admission in Patients with ST-segment Elevation Acute Myocardial Infarction Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention. Circulation Journal.80: 477-484. 2016
16. Kawata H, Ohno S, Sumitomo N, Funasako M, Kamakura T, Nakajima I, Sakaguchi H, Miyazaki A, Miyamoto K, Inoue YY, Okamura H, Noda T, Aiba T, Kusano KF, Kamakura S, Horie M, Shimizu W: Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia (CPVT) associated with Ryanodine Receptor (RyR2) gene mutations: Long term prognosis and utility of an exercise stress test after initiation of medical treatment. Circulation Journal. 80:1907-1915. 2016
17. Itoh H, Spazzolini C, Crotti L, Aiba T, Denjoy I, Fressart V, Hayashi K, Nakajima T, Ohno S, Makiyama T, Wu J, Hasegawa K, Mastantuono E, Dagradi F, Pedrizzini M, Yamagishi M, Berthet M, Murakami Y, Shimizu W, Guicheney P, Schwartz PJ, Horie M: The genetics underlying the acquired long QT syndrome. Impact for genetic screening. European Heart Journal. 37: 1456-1464. 2016
18. Fukuyama M, Ohno S, Makiyama T, Horie M. Novel SCN10A Variants Associated with Brugada Syndrome. Europace. 18: 905-911. 2016

19. Horie M: Molecular Genetics Have Opened a New Era for Arrhythmia Research, but also Pandora's Box? *Journal of Arrhythmia.* 32:313-314. 2016
20. Juang J-M, Horie M: Genetics of Brugada syndrome. *Journal of Arrhythmia.* 32: 418-425. 2016
21. Ohno S. The genetic background of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Journal of Arrhythmia.* 32: 398-403.2016
22. Fujii Y, Itoh H, Ohno S, Murayama T, Kurebayashi N, Aoki H, Blanckard M, Nakagawa Y, Yamamoto S, Matsui Y, Ichikawa M, Sonoda K, Ozawa T, Ohkubo K, Watanabe I, Guicheney P, Horie M: A type 2 ryanodine receptor variant associated with reduced Ca<sup>2+</sup> release and short-coupled torsade de pointe ventricular arrhythmia. *HeartRhythm (in press)*
23. Yagihara N, Watanabe H, Barnett P, Duboscq-Bidot L, Thomas AC, Yang P, Ohno S, Hasegawa K, Kuwano R, Chatel S, Redon R, Schott JJ, Probst V, Koopmann TT, Bezzina CR, Wilde AA, Nakano Y, Aiba T, Miyamoto Y, Kamakura S, Darbar D, Donahue BS, Shigemizu D, Suda M, Sato A, Minamino T, Endo N, Shimizu W, Horie M, Roden DM, Makita N: Variants in the SCN5A promoter associated with various arrhythmia phenotypes. *JAHA.* 5(9). 2016
24. Ozawa J, Ohno S, Hisamatsu T, Itoh H, Makiyama T, Suzuki H, Saitoh A, Horie M. Pediatric cohort with long QT syndrome: KCNH2 mutation carriers have late onset but severe symptoms. *Circulation Journal.* 80: 696-702. 2016
25. Hisamatsu T, Miura K, Arima H, Kadota A, Kadokawa S, Torii S, Suzuki S, Miyagawa N, Sato A, Yamazoe M, Fujiyoshi A, Ohkubo T, Yamamoto T, Abbott RD, Sekikawa A, Horie M, Murata K, Ueshima H, for the SESSA Research Group. Smoking, Smoking Cessation, and Measures of Subclinical Atherosclerosis in Multiple Vascular Beds in Japanese Men. *JAHA* 5(9). 2016
26. Freyermuth F, Rau F, Kokunai Y, Linke T, Sellier C, Nakamori M, Kino Y, Arandel L, Jollet A, Thibault C, Philipp M, Vicaire S, Jost B, Udd B, Day JW, Duboc D, Wahbi K, Matsumura T, Fujimura H, Mochizuki H, Deryckere F, Kimura T, Nukina N, Ishiura S, Lacroix V, Campan-Fournier A, Navratil V, Chautard E, Auboeuf D, Itoh H, Horie M, Imoto K, Lee K-Y, Swanson MS, Lopez de Munain A, Burge C, Wang E, Zimmer T, Furling D, Takahashi MP, Charlet-Berguerand N. Misregulation of the alternative splicing of the cardiac sodium channel SCN5A is associated with cardiac conduction delay and heart arrhythmia in myotonic dystrophy. *Nature Communications.* 7; 11067: 2016
27. Turker I, Makiyama T, Vatta M, Sohma Y, Itoh H, Ueyama T, Shimizu A, Ai T, Horie M: A novel SCN5A variant associate with drug-induced Brugada Syndrome *Plos ONE.* 11:e0161872. 2016
28. Antzelevitch C, Yan GX, Ackerman MJ, Borggrefe M, Corrado D, Guo J, Gussak I, Hasdemir C, Horie M, Huikuri H, Ma C, Morita H, Nam GB, Sacher F, Shimizu W, Viskin S, Wilde AA. J-Wave syndromes expert consensus conference report: Emerging concepts and gaps in knowledge. *Heart Rhythm.* 13:e295-324. 2016
29. Watanabe T, Ohno S, Shirai M, Endoh A, Hongo T, Ueta I, Yoshimoto J: Inherited catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia due to RYR2 mutation. *Pediatr Int.* 58: 512-515. 2016
30. Kubo T, Ashihara T, Tsubouchi T, Horie M: Significance of integrated in silico 2-dimensional transmural ventricular wedge preparation models of human non-failing and failing hearts for evaluation of drug candidates cardiac safety. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.* 18:30-41. 2016
31. Hasegawa K, Watanabe H, Hisamatsu T, Ohno S, Itoh H, Ashihara T, Hayashi H, Makiyama T, Minamino T, Horie M: Early repolarization and risk of arrhythmia events in long QT syndrome. *International Journal of Cardiology.* 223:540-542. 2016
32. Ichikawa M, Aiba T, Ohno S, Shigemizu D, Ozawa J, Sonoda K, Fukuyama M, Itoh H, Minamoto Y, Tsunoda T, Makiyama T, Tanaka T, Shimizu W, Horie M: Phenotypic Variability of ANK2 Mutations in

- Patients with Inherited Primary Arrhythmia Syndromes. Circulation Journal. 2016 (in press)
33. Sasaki K, Makiyama T, Yoshida Y, Wuriyanghai Y, Kamakura T, Nishiuchi S, Hayano M, Harita T, Yamamoto Y, Kohjitani H, Hirose S, Chen J, Itoh H, Kawamura M, Ohno S, Takeuchi A, Matsuoka S, Miura M, Sumitomo N, Horie M, Yamanaka S, Kimura T: Patient-specific Human Induced Pluripotent Stem Cell Model Assessed with Electrical Pacing Validates S107 as a Potential Therapeutic Agent for Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. PlosOne. 11:e0164795. 2016
34. Toyota T, Morimoto T, Shiomi H, Ando K, Ono K, Shizuta S, Kato T, Saito N, Furukawa Y, Nakagawa Y, Horie M, Kimura T: Ad-hoc Versus Non-ad-hoc Percutaneous Coronary Intervention Strategies In Patients with Stable Coronary Artery Disease. Circ J (in press)
35. Itoh H, Berthet M, Fressart V, Denjoy I, Maugrenre S, Klug D, Mizusawa Y, Makiyama T, Hofman N, Shimizu W, Wilde AAM, Schulze-Bahr E, Horie M, Tezenas du Montcel S, Guicheney P. Asymmetry of parental origin in Long QT syndrome. Preferential maternal transmission of KCNQ1 variants linked to channel dysfunction European Journal of Human Genetics. 24: 1160-1166. 2016
36. Okata S, Yuasa S, Suzuki T, Ito S, Makita N, Yoshida T, Li M, Kurokawa J, Seki T, Egashira T, Aizawa Y, Kodaira M, Motoda C, Yozu G, Shimojima M, Hayashiji N, Hashimoto H, Kuroda Y, Tanaka A, Murata M, Aiba T, Shimizu W, Horie M, Kamiya K, Furukawa T, Fukuda K: Embryonic type Na<sup>+</sup> channel β-subunit, SCN3B masks the disease phenotype of Brugada syndrome. Sci Rep. 6:34198 2016
37. H Hayashi, Iwai K, Tobita R, Matsumoto T, Horie M: The relationship between skeletal muscle and ventilatory response to exercise in myocardial infarction. IJC Metabolic and Endocrine. 12:14-18 2016
38. Antzelevitch C, Yan GX, Ackerman MJ, Borggrefe M, Corrado D, Guo J, Gussak I, Hasdemir C, Horie, M Huikuri HV, Ma C, Morita H, Nam GB, Sacher F, Shimizu W, Viskin S, Wilde AAM: J-Wave syndromes expert consensus conference report: Emerging concepts and gaps in knowledge: Endorsed by the Asia Pacific Heart Rhythm Society (APHRS), the European Heart Rhythm Association (EHRA), the Heart Rhythm Society (HRS), and the Latin American Society of Cardiac Pacing and Electrophysiology (Sociedad Latinoamericana de Estimulación Cardíaca y Electrofisiología [SOLAECE]). Europace. 13:euw2352016
39. Antzelevitch C, Yan G-X, Ackerman M-J, Borggrefe M, Corrado D, Guo J, Gussak I, Hasdemir C, Horie M, Huikuri H, Ma C, Morita H, Nam G-B, Sacher F, Shimizu W, Viskin S, Wilde AAM: J-Wave syndromes expert consensus conference report: Emerging concepts and gaps in knowledge. J Arrhythm. 32:315-339. 2016
40. Wu J, Ding W-G, Horie M. Molecular pathogenesis of long QT syndrome type 1. Journal of Arrhythmia. 32: 381-388. 2016