

難治性不整脈の遺伝子解析

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科分子生理学 蔭田直昌

はじめに

単一遺伝子疾患（メンデル型遺伝病）の難治性不整脈のうち、もっとも古くから知られているのは先天性QT延長症候群（long QT syndrome: LQTS）である。これまで多くの家系集積と詳細な臨床解析が行われてきたが、その原因は長らく不明だった。しかし、連鎖解析という遺伝学技術の登場で事態は大きく展開した。連鎖解析とは、それぞれの家系において、遺伝子上に多数存在するマイクロサテライトなどの「遺伝型」と「表現型」を統計解析することによって、原因遺伝子の遺伝子座を染色体上に特定する技術である。連鎖解析によって1995年以降、LQTS 遺伝子として心筋Kチャンネル・Naチャンネルが次々と同定され、「心筋イオンチャンネル病」という新しい疾患概念が生まれた。その後、遺伝子解析技術の急速な進歩によって、特定の遺伝子を迅速にスクリーニングする「候補遺伝子解析」が可能になり、さまざまな遺伝性不整脈の原因遺伝子が次々に明らかになった。

本稿では遺伝子解析の概念や手技を解説するとともに、単一遺伝子疾患の難治性不整脈の代表としてLQTS, Brugada 症候群と特発性心室細動について概説し、遺伝子解析の将来の展望についてもふれる。

遺伝子解析の意義

遺伝子解析は、難治性不整脈の発端者の遺伝子異常のみならず、家系内の変異保有者の発症前診断も可能にし、遺伝子情報に基づく不整脈予防の確立にも道を開いた。しかし、臨床診断と遺伝子診断の結果は常に合致しているわけはでない。たとえばLQTS 家族を調べると、発端者と同じ遺伝子異常を有しながら、安静時のQT時間が正常または境界域の症例がかなりの割合で存在する。これは「不完全浸透」と呼ばれる現象で、無症候性変異キャリアは普段は正常心電図を示していても、何らかの外的刺激によって心電図異常が顕性化して重症不整脈を発生することが考えられる。後天性不整脈の一部には、このような無症候性キャリアが関与していることが示唆される。したがって遺伝子診断は、遺伝性不整脈の発端者や無症候性キャリアを明らかにするだけでなく、薬剤投与前から薬剤性不整脈発生の危険性を予知し、適切な薬剤を選択する「テーラーメイド医療」の実現にも道を開くと考えられる。

遺伝子解析の実際

DNA に用いるゲノムDNAは通常末梢血から抽出するが、頬粘膜や唾液、毛髪などからも抽出できるし、剖検組織から抽出することもある。候

[Key words] 遺伝性不整脈, ゲノムワイド関連解析, 心筋イオンチャンネル病

表1 LQTSの原因遺伝子

サブタイプ	遺伝子	蛋白質	遺伝子座	障害される電流	電流の効果	頻度
Romano-Ward 症候群 (常染色体優性遺伝)						
LQT1	KCNQ1	Kv7.1	11 p 15.5	遅延整流 K (I_{ks})	↓	30~35%
LQT2	KCNH2	Kv11.1	7 q 35-36	遅延整流 K (I_{kr})	↓	25~30%
LQT3	SCN5A	Nav1.5	3 p 21	Na (I_{Na})	↑	5~10%
LQT4	ANK2	Ankyrin-B	4 q 25-27	複数		希
LQT5	KCNE1	MinK	21 q 22.12	遅延整流 K (I_{ks})	↓	希
LQT6	KCNE2	MiRP1	21 q 22.12	遅延整流 K (I_{kr})	↓	希
LQT7*	KCNJ2	Kir2.1	17 q 23.1-24.2	内向き整流 K (I_{K1})	↓	希
LQT8**	CACNA1C	Cav2.1	12 p 13.3	L型 Ca (I_{Ca-L})	↑	希
LQT9	CAV3	Caveolin-3	3 p 25	Na (I_{Na})	↑	希
LQT10	SCN4B	Nav β 4	11 q 23	Na (I_{Na})	↑	希
LQT11	AKAP9	AKAP9	7 q 21-q 22	遅延整流 K (I_{ks})	↓	希
LQT12	SNTA1	syntrophin, α 1	20 q 11.2	Na (I_{Na})	↑	希
LQT13	KCNJ5	Kir3.4	11 q 24.3	内向き整流 K (I_{KAch})	↓	希
Jervell Lange-Nielsen 症候群 (常染色体劣性遺伝)						
JLN1	KCNQ1	Kv7.1	11 p 15.5	遅延整流 K (I_{ks})	↓	希
JLN2	KCNE1	MinK	21 q 22.12	遅延整流 K (I_{ks})	↓	希

* Andersen-Tawil syndrome

** Timothy syndrome

補遺伝子解析は遺伝子のエクソンを中心に行われる。エクソンを両側からはさむ形で1対のプライマーを設計し、PCRによって遺伝子を増幅し、その塩基配列をシーケンサーで決定する（直接シーケンス）か、一本鎖高次構造多型（single strand conformation polymorphism: SSCP）法という方法でスクリーニングする。SSCPは、熱変性させたDNAが分子内で水素結合を起こして高次構造を形成する性質を利用する。完全に同じ配列の一本鎖DNAは同じ高次構造を形成するため電気泳動における移動度は等しくなるが、わずかでも塩基配列が異なると、その一本鎖DNAが形成する高次構造は著しく変わり、電気泳動上の移動度の変化として認識される。

最近、変性高速液体クロマトグラフィ法 (dHPLC) や high resolution melting (HRM) という解析機器・手法の開発によって、1塩基の変化による移動度の変化を正確かつ迅速に解析することが可能になり、スクリーニングの効率が飛躍的に向上した。

単一遺伝子疾患としての不整脈

1. 先天性QT延長症候群 (LQTS)

LQTSは、心室筋の活動電位持続時間が延長し、早期後脱分極によってtorsade de pointes (TdP)などの多形性心室頻拍が発生し、失神や突然死をきたす遺伝性不整脈である。先天性LQTSは、常染色体優性遺伝で嚔唾を伴わないRomano-Ward症候群と、常染色体劣性遺伝で嚔唾を伴うJervell Lange-Nielsen症候群に分類される。最近の分子遺伝学の進歩によって、LQTSは主として、心筋イオンチャネル遺伝子やその調節蛋白に関連する遺伝子異常が原因であることが判明した。先天性LQTSの病態は、心筋細胞の外向き電流の減少または内向き電流の増加による、心室筋活動電位の再分極遅延であるといえることができる。

先天性LQTSには現在13個の原因遺伝子 (LQT1~LQT13) が報告されている (表1)。5~10%の症例は孤発例だが、LQT1 (30~35%)・LQT2 (25~30%)・LQT3 (5~10%) が全体の約75%を占める¹⁾。LQT5~LQT13の多くは候補遺

表2 BrS と ERS の原因遺伝子

サブタイプ	遺伝子	蛋白質	遺伝子座	障害される電流	電流の効果	頻度
BrS1	SCN5A	Nav1.5	3 p 21	Na (I_{Na})	↓	約20%
BrS2	GPD1L	GPD1L	3 p 22.3	Na (I_{Na})	↓	希
BrS3	CACNA1C	Cav1.2 α 1C	12 p 13.3	Ca (I_{Ca})	↓	希
BrS4	CACNB2b	Cav1.2 β 2b	10 p 12	Ca (I_{Ca})	↓	希
BrS5	SCN1B	Nav β 1	19 q 13.12	Na (I_{Na})	↓	希
BrS6	KCNE3	MiRP2	11 q 13.4	一過性外向きK (I_{to})	↑	希
BrS7	SCN3B	Nav β 3	11 q 24.1	Na (I_{Na})	↓	希
BrS8	KCNJ8	Kir6.1	12 p 11.23	K ($I_{K_{ATP}}$)	↑	希
BrS9	CACNA2D1	Cav α 2d	7 q 21.11	Ca (I_{Ca})	↓	希
BrS10	KCND3	Kv4.3	1 p 13.2	一過性外向きK (I_{to})	↑	希
BrS11	MOG1	MOG1	17 p 13.1	Na (I_{Na})	↓	希
BrS12	ABCC9	SUR2A	12 p 12.1	K ($I_{K_{ATP}}$)	↑	希
BrS12	SLMAP	SLMAP	3 p 14.3	Na (I_{Na})	↓	希
ERS1	KCNJ8	Kir6.1	12 p 11.23	K ($I_{K_{ATP}}$)	↑	不明
ERS2	CACNA1C	Cav1.2 α 1C	12 p 13.3	Ca (I_{Ca})	↓	不明
ERS3	CACNB2b	Cav1.2 β 2b	10 p 12	Ca (I_{Ca})	↓	不明
ERS4	CACNA2D1	Cav α 2 δ 1	7 q 21.11	Ca (I_{Ca})	↓	不明
ERS5	ABCC9	SUR2A	12 p 12.1	K ($I_{K_{ATP}}$)	↑	不明
ERS6	SCN5A	Nav1.5	3 p 21	Na (I_{Na})	↓	不明

伝子解析によって解明された遺伝子である。LQT1の原因遺伝子は、遅延整流K電流 (IK) の活性化の遅い成分 (IKs) の α サブユニット *KCNQ1* で、LQT2の原因遺伝子は、活性化の速いIK成分 (IK_r) の α サブユニット *KCNH2* である。これらのチャネルの機能喪失 (loss-of-function) は第3相のIK電流を低下させ再分極を遅延させる。LQT3の原因遺伝子は、心筋Naチャネル α サブユニット *SCN5A* で、変異チャネルのもつ不活性化障害によって微量のNaが再分極相にまで流入するため (gain-of-function)、QT時間が延長する。

LQTSの臨床像は遺伝型によってかなり異なることが次第に明らかになってきた。とくに心電図のT波の形状²⁾や心事故の誘因³⁾には遺伝型特異的な特徴がある。また、遺伝子変異の部位にも臨床像や予後との関連がある。たとえばLQT2の心イベントの発生率は、チャネル孔領域の変異をもつ群のほうが、その他の領域の変異よりも高い⁴⁾。LQT1では膜ドメインの変異例のほうがC末端変異よりも不整脈事故が多く、交感神経活動

に鋭敏に反応する⁵⁾。またLQTSでは、遺伝子異常を有しながら診断基準を満たさない非浸透患者が少なくない。LQTS家系内の非浸透患者を早期に同定し、突然死の予防治療を検討することは重要で、そのためにも遺伝子診断は不可欠である。このように、LQTSでは遺伝子情報が患者の治療や生活指導に還元されており、遺伝子検査は保険償還されている。

2. Brugada 症候群

Brugada 症候群 (Brugada syndrome: BrS) は、右側胸部誘導の coved 型・saddle-back 型 ST 上昇を特徴とする、器質的心疾患のない心室細動である。中年男性の突然死の原因として知られる「ぽっくり病」と同一の疾患と考えられ、日本を含めた東洋人の罹患率が高い。患者全体の20~30%に *SCN5A* の変異が同定される (BrS1)⁶⁾。LQTSと同様、BrS 症候群にも現在13個の原因遺伝子が知られているが (表2)、BrS2~12は稀有で孤発例も多く、*SCN5A* 変異のない70~80%のBrSの主たる原因遺伝子は依然不明である。

3. 特発性心室細動・早期再分極症候群

心室細動 (VF) による突然死症例は、冠動脈疾患・心筋症・弁膜症などの何らかの基礎心疾患を有することが多いが、器質的心疾患や明白な心電図異常のない VF 症例は、特発性心室細動 (idiopathic ventricular fibrillation: IVF) と呼ばれる⁷⁾。IVF は若年者における突然死の約10%を占めるといわれ⁸⁾、約30%の症例は VF を再発する予後不良の不整脈である。唯一の有効な治療法は植込み型除細動器 (implantable cardioverter defibrillator: ICD) である。一方、IVF の20%の症例に突然死の家族歴があることから⁹⁾、少なくとも一部には遺伝的な要因が関与していると推測される^{7,8,10)}。しかし、IVF の患者には特徴的な心臓の構造異常や機能異常がないため基本的に除外診断であるため、突然死のリスクをもつ個人を発症前に同定するのはきわめて困難である。

Haissaguerre らは IVF 蘇生症例206例を再検討したところ、31%に下壁・側壁誘導の QRS 直後に0.1 mV 以上の J 点の上昇 (ノッチやスラー) を認めた¹¹⁾。QRS-ST 接合部 (J 点) の上昇は健常人にもしばしばみられるため、一般に良性の心電図変化であると考えられてきたが、必ずしも予後良好なバリエーションではなく、部位や広がりによって予後不良の予測因子であると考えられている。早期再分極パターンを伴った VF 症例は早期再分極症候群 (early repolarization syndrome: ERS) と定義される。これまでいくつかの ERS 変異の報告はあるものの、現時点で確定した原因遺伝子はない。K_{ATP} チャンネルの一つ Kir6.1 遺伝子 (*KCNJ8*) に変異 S422L が同定され、その変異チャンネルは K_{ATP} チャンネルの機能を亢進させることが報告された^{12,13)}。しかし、Kir6.1 は心筋での発現量が低いサブユニットであり、同定される変異が唯一 S422L のみであることなどから、人種特異的な rare variant の可能性もぬぐえず、ERS の原因遺伝子として確立しているとはいえない。

ERS と BrS には臨床的な類似点がある。たとえば、β 刺激薬や quinidine は両症候群に共通し

て有効であり、男性が多いことも類似している。また、BrS 患者の中で、下側壁誘導の早期再分極波形が不整脈発作の予後予測因子であるという事実も両症候群の関連を示唆している¹⁴⁾。Antzelevitch は最近、「J 波症候群」という概念を提唱した¹⁵⁾。BrS は右室の異常によって V₁₋₃ で J 波が明らかになるのに対して、ERS は左室の前側壁や下壁で起きる異常によって I, V₄₋₆, II, III, aVF で J 波がみられる。しかし、これらはすべて共通した機序をもつ「J 波症候群」として扱うべきと主張するものである。さらに、BrS と ERS を合併する家系に、Ca チャンネルのサブユニット α1C (*CACNA1C*), β2b (*CACNB2b*), α2δ1 (*CACNA2D1*) の遺伝子異常が認められることを報告し (表2)、両者にオーバーラップがあることも示唆している¹⁶⁾。われわれも同様に、J 波を伴った IVF 患者に3例の *SCN5A* 変異を同定した¹⁷⁾。これらの事実は、Antzelevitch の提唱するように、ERS と BrS にはある程度のオーバーラップがあることを立証していると思われる。

多因子遺伝子疾患としての不整脈

先天性 LQTS や QT 短縮症候群 (short QT syndrome: SQTS) などで同定される遺伝子変異は、頻度はまれであるが、心筋再分極を極端に延長・短縮する不整脈基質の遺伝的な「決定因子」である。一方、QT 時間のばらつきは正常人にも観察されるものであり、心拍数、年齢、性、電解質、薬物などのさまざまな「修飾因子」によって影響を受けるように、多因子遺伝子疾患としての側面をもつ¹⁸⁾。再分極の感受性因子を明らかにするひとつの方法は、LQTS や SQTS の原因遺伝子に存在する遺伝子多型を患者群と対照群で比較する集団関連研究 (population based association study) である。健常者689人 (KORA study) のゲノムを用いて、4つの LQTS 原因遺伝子 (*KCNQ1*, *KCNH2*, *KCNE1*, *KCNE2*) 上の174個の単一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) と補正 QT 時間との関連を解析し、

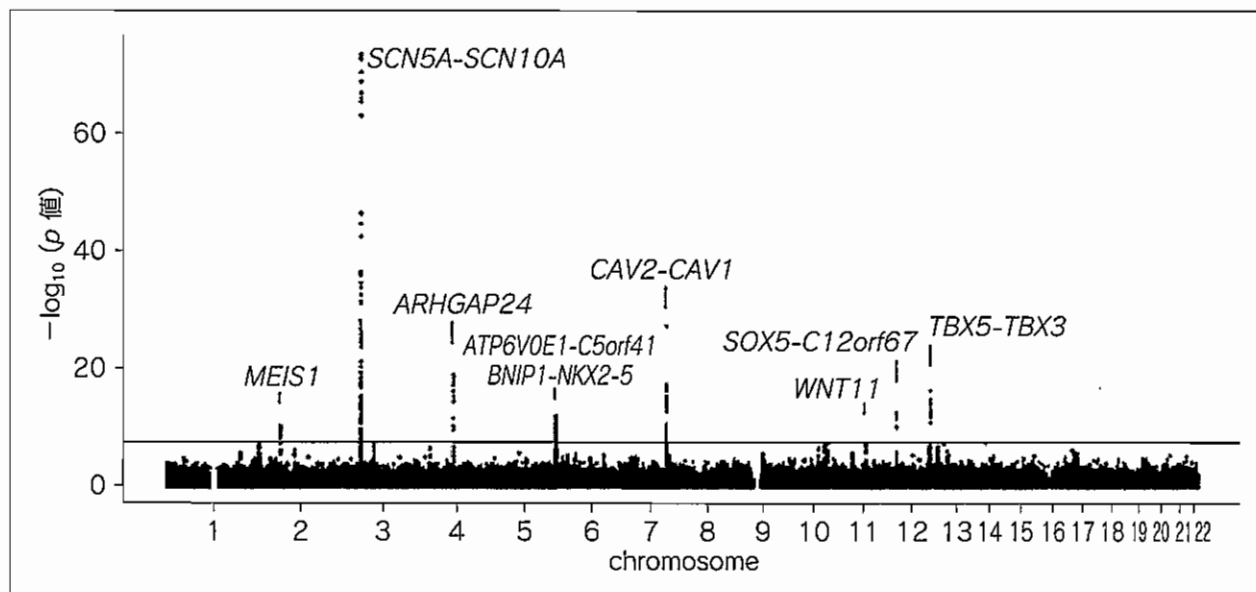


図1 心電図PR時間に関するゲノムワイド関連解析 (GWAS)

GWASに用いられたそれぞれのSNPの染色体上の部位(横軸)と*p*値(縦軸, 対数表示)を示すマンハッタンプロット。閾値 5×10^{-8} が横線で示されており, 代表的な遺伝子名も記載されている。染色体3のSCN5A-SCN10Aの近傍はもっとも*p*値が高く, PR時間を規定する感受性遺伝子がこの領域に存在することが示されている。(文献23より引用)

QTを1~2 msec延長, または短縮するSNPがKCNQ1とKCNH2に同定された^{19,20}。この3つのSNPは単独ではQT時間に与える影響は小さいが, それらが組み合わさることによって相加的に効果が増強する。これは, 心筋再分極はイオンチャネル遺伝子多型に影響される複雑な遺伝的素因であるということを示している。

多遺伝子疾患の原因遺伝子を同定するより強力な方法のひとつは, ひと固まりとなって遺伝されるSNPの集団「ハプロタイプ」を網羅的にスクリーニングする, ゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study: GWAS) という手法である。この解析方法によって, 心筋再分極を修飾する遺伝的素因としてNOS1APが同定された。また, 心房細動 (AF) の危険因子を解明するGWASにおいては, 染色体4q25の2つのSNPが同定され²¹、心拍数, PR時間, QRS時間の修飾遺伝子の部位も次々に報告された (図1)^{22~25}。これらの研究の多くは, 修飾遺伝子のゲノム上の位置を同定しているが, 現時点では具体的な遺伝子やバリエーションの機能評価にはいたっていない。しかし, AF関連のSNPの近傍には心臓の左右非

対称性に重要な役割をもつ遺伝子PITX2が存在し, 心臓伝導時間関連遺伝子の近傍には心筋Naチャネル遺伝子SCN5A, SCN10Aが存在していることが判明しており, さらなる研究の進展が期待される。

未知の原因遺伝子の解明

不整脈の原因遺伝子を解明する場合, 大きな家系があれば連鎖解析によって未知の遺伝子座を探索することが可能である。しかし難治性不整脈では一般に大家系は少なく, 突然死が唯一の表現型であることもあり, 多くの家族を集積することが困難なことが多い。一方, GWASを行うほどの患者総数も多くない。このような希少性疾患の未知の遺伝子を解明するための強力な科学技術が, 全エクソン解析 (エクソーム) や全ゲノムのような, 次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析技術である。不整脈の領域における発表はまだ少ないが, 遺伝子判明率の低いBrS症候群やIVFに応用すれば新たな原因遺伝子が解明され, 大きな進歩をもたらすことが期待される。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

- 1) Kass RS, Moss AJ: Long QT syndrome: novel insights into the mechanisms of cardiac arrhythmias. *J Clin Invest* 2003; **112**: 810-815
- 2) Moss AJ, Zareba W, Benhorin J et al: ECG T-wave patterns in genetically distinct forms of the hereditary long QT syndrome. *Circulation* 1995; **92**: 2929-2934
- 3) Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C et al: Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation* 2001; **103**: 89-95
- 4) Moss AJ, Zareba W, Kaufman ES et al: Increased risk of arrhythmic events in long-QT syndrome with mutations in the pore region of the human ether-a-go-go-related gene potassium channel. *Circulation* 2002; **105**: 794-799
- 5) Shimizu W, Horie M, Ohno S et al: Mutation site-specific differences in arrhythmic risk and sensitivity to sympathetic stimulation in the LQT1 form of congenital long QT syndrome: multicenter study in Japan. *J Am Coll Cardiol* 2004; **44**: 117-125
- 6) Chen Q, Kirsch GE, Zhang D et al: Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 1998; **392**: 293-296
- 7) Viskin S, Belhassen B: Idiopathic ventricular fibrillation. *Am Heart J* 1990; **120**: 661-671
- 8) Consensus Statement of the Joint Steering Committees of the Unexplained Cardiac Arrest Registry of Europe and of the Idiopathic Ventricular Fibrillation Registry of the United States: Survivors of out-of-hospital cardiac arrest with apparently normal heart: need for definition and standardized clinical evaluation. *Circulation* 1997; **95**: 265-272
- 9) Haïssaguerre M, Shoda M, Jaïs P et al: Mapping and ablation of idiopathic ventricular fibrillation. *Circulation* 2002; **106**: 962-967
- 10) Noda T, Shimizu W, Taguchi A et al: Malignant entity of idiopathic ventricular fibrillation and polymorphic ventricular tachycardia initiated by premature extrasystoles originating from the right ventricular outflow tract. *J Am Coll Cardiol* 2005; **46**: 1288-1294
- 11) Haïssaguerre M, Derval N, Sacher F et al: Sudden cardiac arrest associated with early repolarization. *N Engl J Med* 2008; **358**: 2016-2023
- 12) Medeiros-Domingo A, Tan B-H, Crotti L et al: Gain-of-function mutation, S422L, in the KCNJ8-encoded cardiac K_{ATP} channel Kir6.1 as a pathogenic substrate for J-Wave syndromes. *Heart Rhythm* 2010; **7**: 1466-1471
- 13) Barajas-Martinez H, Hu D, Ferrer T et al: Molecular genetic and functional association of Brugada and early repolarization syndromes with S422L missense mutation in KCNJ8. *Heart Rhythm* 2012; **9**: 548-555
- 14) Kamakura S, Ohe T, Nakazawa K et al: Long-term prognosis of probands with Brugada-pattern ST-elevation in leads V1-V3. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2009; **2**: 495-503
- 15) Antzelevitch C, Yan G-X: J wave syndromes. *Heart Rhythm* 2010; **7**: 549-558
- 16) Burashnikov E, Pfeiffer R, Barajas-Martinez H et al: Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J wave syndromes and sudden cardiac death. *Heart Rhythm* 2010; **7**: 1872-1882
- 17) Watanabe H, Nogami A, Ohkubo K et al: Electrocardiographic characteristics and SCN5A mutations in idiopathic ventricular fibrillation associated with early repolarization. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2011; **4**: 874-881
- 18) Risch NJ: Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 2000; **405**: 847-856
- 19) Pfeufer A, Jalilzadeh S, Perz S et al: Common variants in myocardial ion channel genes modify the QT interval in the general population: results from the KORA study. *Circ Res* 2005; **96**: 693-701
- 20) Bezzina CR, Verkerk AO, Busjahn A et al: A common polymorphism in KCNH2 (HERG) hastens cardiac repolarization. *Cardiovasc Res* 2003; **59**: 27-36
- 21) Gudbjartsson DF, Arnar DO, Helgadottir A et al: Variants conferring risk of atrial fibrillation on chromosome 4q25. *Nature* 2007; **448**: 353-357
- 22) Smith JG, Jennifer KL, Sirisha K et al: Genome-wide association study of electrocardiographic conduction measures in an isolated founder population: Kosrae. *Heart Rhythm* 2009; **6**: 634-641
- 23) Pfeufer A, van Noord C, Marcianti KD et al: Genome-wide association study of PR interval. *Nat Genet* 2010; **42**: 153-159
- 24) Holm H, Gudbjartsson DF, Arnar DO et al: Several common variants modulate heart rate, PR interval and QRS duration. *Nat Genet* 2010; **42**: 117-122
- 25) Chambers JC, Zhao J, Terracciano CMN et al: Genetic variation in SCN10A influences cardiac conduction. *Nat Genet* 2010; **42**: 149-152