

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業  
(英語) Practical Research Project for Rare / Intractable Diseases

研究開発課題名： (日本語) 遺伝性徐脈性難病 (Kir3.1/3.4 channelopathy) に対するコンパニオン診断の確立および心臓アセチルコリン感受性カリウムチャネル選択的阻害薬による新規治療法開発  
(英語) Development of a genetic diagnosis and a new therapy for sinus bradycardia and atrial bradyarrhythmia

研究開発担当者 (日本語) 大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科学 講師 朝野仁裕  
所属 役職 氏名： (英語) Osaka University Graduate School of Medicine,  
Department of Cardiovascular Medicine,  
Associate Professor (Lecturer)  
Yoshihiro Asano, MD. Ph.D.

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究開発課題名 1：

(日本語) 遺伝性徐脈症例の収集と遺伝子解析

－ ターゲットシーケンスパネル開発とゲノムシーケンスおよび臨床診断法の開発

(英語) Development of a genetic diagnosis and a new therapy for sinus bradycardia and atrial Bradyarrhythmias

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 滋賀医科大学 アジア疫学研究センター 特任講師 大野聖子

(英語) Shiga University of Medical Science,  
Center for Epidemiologic Research in Asia,  
Specially Appointed Associate Professor,  
Seiko Ohno

分担研究開発課題名 2 :

(日本語) 遺伝性徐脈疾患に対する新規治療法開発における製剤の提供および臨床試験デザイン

(英 語) Development of a genetic diagnosis and a new therapy for sinus bradycardia and atrial  
Bradyarrhythmias

研究開発分担者 所属 役職 氏名 :

(日本語) 日産化学工業株式会社 医薬品事業部企画開発部 部長 山下 徹

(英 語) Nissan Chemical Industries, Ltd.,

Pharmaceuticals Division, Planning & Development Department,

General Manager,

Toru Yamashita

## II. 成果の概要（総括研究報告）

### <和文概要>

国内における遺伝子変異を有する心房細動、洞徐脈、洞停止、洞房ブロック、房室ブロックを示す患者数を明らかにすべく、臨床検体の収集及びゲノム解析を実施した。

#### 1. ゲノム解析レジストリからの検体供与とゲノム解析の実施

Pivotal 試験に先立ち、対象疾患（遺伝性徐脈性難病）の症例蓄積を目指して既存コホート研究から大規模なゲノム供与を受け解析を開始した。コホート 1 解析として、共同研究・研究協力機関に依頼し、心房細動 Registry に登録された症例のゲノムスクリーニングを行った。対象疾患（遺伝性徐脈性難病）の頻度探索を行うため、関連 3 遺伝子（遺伝子 X、遺伝子 Y、遺伝子 Z）のアミノ酸コード領域に存在する希少変異を同定できる専用解析パイプラインのシステム構築を行った。超高速シーケンサーを用いた混合検体による一次ゲノムスクリーニングの実験系の立ち上げと、100 検体を用いたパイロット試験は終了し、残る症例に対する解析を継続実施中である。既にいくつかの希少変異候補を同定始めており、解析対象の増加によりさらに情報を蓄積しているものと類推している。

#### 2. 不整脈疾患症例の蓄積（レトロスペクティブ・プロスペクティブ症例レジストリ）

遺伝子変異を有する症例の臨床転帰を明らかにするために、そして症例予後を含めた臨床情報を収集するゲノム解析の前向き症例蓄積のためレジストリ構築を開始した。2つの研究機関群において、ゲノム解析は、薬理的有効性が見込まれる遺伝子 X、Y、Z に変異を有する症例を対象とし、心房細動、洞徐脈、洞停止、洞房ブロック、房室ブロック症例も含める。今年度約 400 症例の遺伝性徐脈該当症例から、遺伝子 X に 1 つ、遺伝子 Y に 2 つの新しい希少変異を検出した。今後その病態意義を解析予定である。「遺伝性徐脈・心臓伝導障害疾患レジストリ」を構築のため、必要となる EDC (Electronic Data Capture システム) の作製を行い、症例スクリーニングを開始した。EDC を用いた登録を各施設においても実施するため CRC を派遣しスクリーニングおよび登録開始する予定である。2017 年度以降は構築したレジストリの維持管理も開始する予定である。

#### 3. 化合物 A の作用機序の詳細説明

遺伝子 X がコードする X 蛋白チャネルにおいて、本薬剤がどのように阻害効果を有するかに関して、より詳細なチャネル電流の変化を、細胞実験系で追試確認を行った。本チャネルの阻害薬が心房細動、徐脈性不整脈いずれにも効果を有することを分子機序からサポートする基礎データとして、必要であり、本検討を完成させることで、阻害薬は変異体においてより一層親和性が高いことが証明された。ゼブラフィッシュを用いた表現型解析により、変異に依拠する心房細動、洞徐脈、洞停止、洞房ブロック、房室ブロックの表現型を詳細に解析することができ、薬効評価における再現性も確認された。

### <English Summary>

Normal heart rate and rhythm is essential for proper functioning of the heart that pumps blood through the circulatory system. Bradyarrhythmia is caused by the disorder of sinus impulse generation and/or impulse propagation in the cardiac conduction system. Symptomatic bradyarrhythmia is a life-threatening disease and requires prompt and proper medical care. As

several ion channels regulate cardiac pacemaker activity and conduction system, ion-channel proteins are good candidates for the treatment of impaired heart rate and rhythm.

We identified novel genes assumed to be involved in arrhythmia episodes from families with an autosomal dominant genetic form. The disease showed a very high penetrance rate, and another non-synonymous mutation in the same gene could be identified from another family that allowed familial onset. Co-segregation and exclusion of Japanese common variant can also be confirmed, confirming that this gene is the causative gene of this arrhythmia. By developing specific inhibitors, development as a first in class remedy for this disease is expected. For the reasons above, we made a study plan by 3 steps in 2016.

### **I. Genome analysis of samples from 3000 patients using NGS screening system**

We have firstly identified a novel mutation in Gene X in a pedigree as a responsible gene for an early onset of sinus nodal and atrial bradyarrhythmias. To elucidate the etiology of this disease, we performed genome analysis with targeting on the responsible Gene X and its related two genes (Gene Y and Gene Z) using next generation sequencing (NGS) analysis. We used samples from the genome cohort for this analysis. As the study population of this cohort amounted up to 3000, we have made a plan to establish a two-step mass screening system for these samples. To confirm the feasibility of our mass screening system, we firstly performed a pilot NGS analysis (with checking our sequencing protocol and original informatics pipelines). Now our plan move to the second step of the program to complete our mass screening.

### **II. Collection of family samples with this disease, and establishment of genome registry for NGS screening system**

To reveal the etiology of this disease, we have developed genome cohort registry for this disease (sinus nodal and atrial bradyarrhythmias). In 2016, 400 patients have already registered. And we have already analyzed them and identified 3 novel mutations (1 from Gene X, 2 from Gene Y). The samples were collected using clinical genome cohort system of our genome registry using EDC (electronic data capture system).

### **III. Elucidation of the mechanism of ProteinX-specific inhibitor (Compound A)**

Gene X encodes an ion channel X in the heart. By electrophysiological studies in *Xenopus* oocyte and mammalian cell expression systems, the mutation increased the open probability of channel X, resulting in the increase of the current this channel. A specific channel X blocker (Compound A) repressed these increases in a dose dependent manner. Furthermore, treatment by Compound A to transgenic zebrafish greatly improved the phenotype of this arrhythmias.

Taken together, a novel rare mutation of Gene X evoked hereditary atrial arrhythmias, increasing the basal current amplitude of channel X. And its selective blocker Compound A might be a strong candidate to cure the patients with these arrhythmias caused by Gene X gain-of-function mutation.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国際誌 14 件、国内誌 0 件）

<朝野仁裕>

1. Masumura Y, Higo S, Asano Y, Kato H, Yan Y, Ishino S, Tsukamoto O, Kioka H, Hayashi T, Shintani Y, Yamazaki S, Minamino T, Kitakaze M, Komuro I, Takashima S, Sakata Y. Btg2 is a Negative Regulator of Cardiomyocyte Hypertrophy through a Decrease in Cytosolic RNA. *Sci Rep*. 2016, 6, 28592.
2. Okuda K, Fu HY, Matsuzaki T, Araki R, Tsuchida S, Thanikachalam PV, Fukuta T, Asai T, Yamato M, Sanada S, Asanuma H, Asano Y, Asakura M, Hanawa H, Hao H, Oku N, Takashima S, Kitakaze M, Sakata Y, Minamino T. Targeted Therapy for Acute Autoimmune Myocarditis with Nano-Sized Liposomal FK506 in Rats. *PLoS One*. 2016, 11, e0160944.
3. Kitagaki J, Miyauchi S, Asano Y, Imai A, Kawai S, Michikami I, Yamashita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S. A Putative Association of a Single Nucleotide Polymorphism in GPR126 with Aggressive Periodontitis in a Japanese Population . *PLoS One*. 2016 Aug 10;11(8):e0160765.
4. Ma J, Luo T, Zeng Z, Fu H, Asano Y, Liao Y, Minamino T, Kitakaze M. Histone Deacetylase Inhibitor Phenylbutyrate Exaggerates Heart Failure in Pressure Overloaded Mice independently of HDAC inhibition. *Sci Rep*. 2016, 6, 34036.
5. Ito S, Asakura M, Liao Y, Min KD, Takahashi A, Shindo K, Yamazaki S, Tsukamoto O, Asanuma H, Mogi M, Horiuchi M, Asano Y, Sanada S, Minamino T, Takashima S, Mochizuki N, Kitakaze M. Identification of the Mtus1 Splice Variant as a Novel Inhibitory Factor Against Cardiac Hypertrophy. *J Am Heart Assoc*. 2016, 5, e003521.
6. Kondo H, Maksimova N, Otomo T, Kato H, Imai A, Asano Y, Kobayashi K, Nojima S, Nakaya A, Hamada Y, Irahara K, Gurinova E, Sukhomyasova A, Nogovicina A, Savvina M, Yoshimori T, Ozono K, Sakai N. Mutation in VPS33A affects metabolism of glycosaminoglycans: a new type of mucopolysaccharidosis with severe systemic symptoms. *Hum Mol Genet*. 2017, 26, 173-183.

<大野聖子>

1. Yamagata K, Horie M, Aiba T, Ogawa S, Aizawa Y, Ohe T, Yamagishi M, Makita N, Sakurada H, Tanaka T, Shimizu A, Hagiwara N, Kishi R, Nakano Y, Takagi M, Makiyama T, Ohno S, Fukuda K, Watanabe H, Morita H, Hayashi K, Kusano K, Kamakura S, Yasuda S, Ogawa H, Miyamoto Y, Kapplinger JD, Ackerman MJ and Shimizu W. Genotype-Phenotype Correlation of SCN5A Mutation for the Clinical and Electrocardiographic Characteristics of Proband with Brugada Syndrome: A Japanese Multicenter Registry. *Circulation*. 2017 (In press)
2. Ishikawa T, Ohno S, Murakami T, Yoshida K, Mishima H, Fukuoka T, Kimoto H, Sakamoto R, Ohkusa T, Aiba T, Nogami A, Sumitomo N, Shimizu W, Yoshiura KI, Horigome H, Horie M and Makita N. Sick sinus syndrome with HCN4 mutations shows early onset and frequent association with atrial fibrillation and left ventricular noncompaction. *Heart Rhythm*. 2017;14:717-724.

3. Fujii Y, Itoh H, Ohno S, Murayama T, Kurebayashi N, Aoki H, Blancard M, Nakagawa Y, Yamamoto S, Matsui Y, Ichikawa M, Sonoda K, Ozawa T, Ohkubo K, Watanabe I, Guicheney P and Horie M. A type 2 ryanodine receptor variant associated with reduced Ca<sup>2+</sup> release and short-coupled torsades de pointes ventricular arrhythmia. *Heart Rhythm*. 2017;14:98-107.
4. Sonoda K, Ohno S, Otuki S, Kato K, Yagihara N, Watanabe H, Makiyama T, Minamino T and Horie M. Quantitative analysis of PKP2 and neighbouring genes in a patient with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by heterozygous PKP2 deletion. *Europace*. 2017;19:644-650.
5. Kawata H, Ohno S, Aiba T, Sakaguchi H, Miyazaki A, Sumitomo N, Kamakura T, Nakajima I, Inoue YY, Miyamoto K, Okamura H, Noda T, Kusano K, Kamakura S, Miyamoto Y, Shiraishi I, Horie M and Shimizu W. Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia (CPVT) Associated With Ryanodine Receptor (RyR2) Gene Mutations - Long-Term Prognosis After Initiation of Medical Treatment -. *Circulation Journal*. 2016;80:1907-1915.
6. 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, Pedrazzini M, Yamagishi M, Berthet M, Murakami Y, Shimizu W, Guicheney P, Schwartz PJ and Horie M. The genetics underlying acquired long QT syndrome: impact for genetic screening. *Eur Heart J*. 2016;37:1456-1464.
7. Ichikawa M, Aiba T, Ohno S, Shigemizu D, Ozawa J, Sonoda K, Fukuyama M, Itoh H, Miyamoto Y, Tsunoda T, Makiyama T, Tanaka T, Shimizu W and Horie M. Phenotypic Variability of ANK2 Mutations in Patients With Inherited Primary Arrhythmia Syndromes. *Circ J*. 2016;80:2435-2442.
8. Fukuyama M, Ohno S, Makiyama T and Horie M. Novel SCN10A variants associated with Brugada syndrome. *Europace*. 2016;18:905-11.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

<朝野仁裕>

1. 難治性遺伝性循環器疾患における全エクソーム解析と家系症例に対する臨床遺伝子診断の試み、口頭、朝野仁裕、第20回日本心不全学会学術集会（シンポジウム）、2016/10/8、国内

<大野聖子>

1. Ohno S, Wu J, Sonoda K, Itoh H, Makiyama T, Horie M : Triple mutations in three major genes for long QT syndrome are very rare but produce severe phenotypes. ESC CONGRESS 2016 (8.26-9.1 Rome, Italy) ポスター 国外
2. Ohno S, Ozawa J, Fujii Y, Itoh H, Horie M : Specific Phenotypes Caused by RYR2 Mutations Relate with Bradycardia but not with Mutation Locations in RYR2. ESC

- CONGRESS 2016 (8.26-9.1 Rome, Italy) ポスター 国外
3. Ohno S: The RYR2 Mutations Identified Not Only in CPVT But Also Short Coupled Variant of Torsade De Pointes and LQTS. (APHRs2016, 10.12-15,Korea) シンポジウム 口頭 国外
  4. Ohno S: What' s New in 2016; Genetics in ARVC/D. (APHRs2016, 10.12-15,Korea) シンポジウム 口頭 国外
  5. Ohno S, Ozawa J, Fukuyama M, Makiyama T, Horie M. High prevalence of late onset T in patients with long QT syndrome type 8. (AHA2016, 11.12-16, New Orleans, USA) ポスター 国外
  6. Ohno S, ミート・ザ・エキスパート 4 循環器診療における遺伝情報の適切な活用を目指す: Genomics Mini Boot Camp; Can We Detect and Know All the Pathogenic Mutations by Next Generation Sequencer in Patients with Inherited Cardiovascular Diseases? 第 8 1 回日本循環器学会学術集会. (2017.3.17-19 金沢) 口頭 国内
  7. Ohno S, Symposium 7 Mechanisms Underlying Brugada Syndrome: Genetic background of Brugada syndrome. 第 63 回日本不整脈心電学会学術集会 (2016.7.14-17 札幌) 口頭 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
該当なし

(4) 特許出願  
該当なし