HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	QT延長症候群における責任遺伝子複合変異は小児期の心イベントを増加させる
Author(s)	泉, 岳
Description	配架番号：2072
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11200号
Issue Date	2014-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11200
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61601
Type	doctoral thesis
File Information	Gaku_Izumi.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

QT 延長症候群における責任遺伝子複合変異は小児期の心イベントを増加させる

Compound mutations cause increased cardiac events in children with Long QT syndrome

2014 年 3 月

北海道大学

泉　岳

目次

発表論文目録および学会発表目録　・・・・・・・・・・　１頁

緒言　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　２頁

略語表　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　８頁

実験方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　９頁

実験結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１６頁

考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・３４頁

総括および結論　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・３８頁

謝辞　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・４０頁

引用文献　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・４１頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である。

１．Gaku Izumi, Emiko Hayama, Kei Inai, Michiko Furutani,
Tsutomu Nishizawa, Yoshiyuki Furutani, Mitsuyo Shimada,
Rumiko Matsuoka, Toshio Nakanishi
"Compound mutations cause increased cardiac events in children with Long QT syndrome"

Heart Rhythm

本研究の一部は以下の学会に発表した。

１．Gaku Izumi, Michiko Furutani, Tsutomu Nisizawa, Yoshiyuki Furutani,
Tsutomu Nishizawa, Yoshiyuki Furutani, Mitsuyo Shimada,
Rumiko Matsuoka, Nakanishi Toshio
"Double gene mutations in Long QT syndrome can cause significantly increased cardiac event during childhood"

American Heart Association November 5, 2012 Scientific Session
in Los Angels, USA

緒言

遺伝性不整脈疾患には、QT 延長症候群、Brugada 症候群、QT 短縮症候群、カテコラミン誘発性多形性心室頻拍、進行性心臓伝導欠損、家族性洞機能不全、家族性心房細動などが含まれる。遺伝性不整脈のうち原因遺伝子が特定されているタイプは、各遺伝子変異によって発現する蛋白とそれに関連するイオンチャネルに異常をきたし、特徴的な心電図変化や不整脈を発症すると考えられている。このようなイオンチャネル異常に基づく不整脈疾患を総称して「イオンチャネル病」とも言われている。最近の遺伝子型と表現形（心電図や臨床所見）との詳細な検討により、遺伝子型別あるいは遺伝子変異部位別の予後、特異的治療などが可能となりつつある。

遺伝性不整脈疾患の中で最も頻度の多い QT 延長症候群 (long-QT 症候群, 以下 LQT 症候群)は、心電図上 QT 時間の延長を認め、torsade de pointes (TdP)と呼ばれる特殊な多形性心室頻拍や心室細動などの心室性不整脈によりめまい、失神などの脳虚血症状や突然死をきたす心疾患である[1, 31-34, 41-46]。

LQT 症候群の診断には一般に心拍数補正した修正 QT 時間 (QTc= QT / √RR)が 440msec 以上を QT 延長と定義するが、LQT 症候群の診断には QT 時間の延長以外に T-U 波の形態など複数の項目から診断を行う。

LQT 症候群の治療は、QT 延長に伴って生じる多形性心室頻拍の TdP 発症時 の治療(急性期治療)と TdP およびこれによる心停止、突然死予防のための治療 (予防治療)に分けられる。TdP は自然停止する場合と持続して心室細動に移行する場合がある。心室細動に移行すれば、ただちに電気的除細動が必要となる。TdP の停止と急性再発予防には硫酸マグネシウムの静注が有効である。徐脈が TdP 発症を助長すれは、一時的ペーシングで心拍数を増加させる。再発予防の基本はβ遮断薬であるが、徐脈の増悪が予測されれば、一時的ペーシングを併用する。症例によっては抗不整脈薬 (リドカインおよびメキシレチン)が TdP 停止に有効なこともある。なお低 K 血症は TdP 発症を助長するので是正する。

非薬物治療には植込み型除細動器治療、ペースメーカー治療、左側交感神経節切除術がある。これらの治療法は、発作誘引となる運動制限や QT 延長をもたらす薬物使用の制限など日常生活の注意点を守り、さらに上記のような薬物治療を十分行った上でも致死的発作がコントロールできない可能性が高い場合に選択される。

遺伝性 LQT 症候群は、常染色体劣性遺伝で先天性難聴を伴う Jervell Lange-Nielsen 症候群が 1957 年に最初に報告され、常染色体優性遺伝で先天性難聴を伴わない Romano-Ward 症候群が後に報告された。

Jevell Lange-Nielsen 症候群は非常に稀な症候群であり、これまでの報告では先天性 LQT 症候群というと一般に Romano-Ward 症候群のことを指すことが多いため、これに従い、以後本稿で先天性 LQT 症候群の記載をした場合、Romano-Ward 症候群のことを指すこととする。

先天性 LQT 症候群は現在までに 10 個の遺伝子型が報告されており、それが確認された順番に LQT1～LQT10 と呼ばれている。1995 年に先天性 QT 延長症候群患者で最初の原因遺伝子が同定されて以来、7 つの染色体上に 10 個の遺伝子型が報告されている。いずれの遺伝子型でも、心室筋活動電位プラトー相の外向き電流が減少 (loss of function) するか、または内向き電流が増加 (gain of function) することにより活動電位持続時間か延長し、共通の表現型である心電図上の QT 延長を呈する。これまでに報告された多数例の調査では、先天性 QT 延長症候群の死亡率は 0.9 ~ 2.6% /年とされているが、 初回発作が突然死である症例もある。

近年の分子遺伝学的解析により、心筋の電位依存性 K チャネルのサブユニットをコードする KCNQ1, KCNH2, KCNE1, KCNE2 と、心筋の電位依存性 Na チャネルのサブユニットをコードする SCN5A の遺伝子変異が順次同定され、Romano-Ward 症候群の原因であると報告されている[2,35-40]。KCNQ1 遺伝子変異による LQT 症候群を LQT１型、KCNH2、SCN5A 遺伝子変異による LQT 症候群をそれぞれ LQT２型、LQT３型と型別がなされている。先天性 LQTS の遺伝子診断率は世界的にみても 50 ~ 70%である。すなわち先天性 LQT 症候群と臨床診断がついた患者あるいは家族構成員の半数以上で遺伝子型が同定される。遺伝子診断される患者の中における各遺伝子型の頻度は LQT1 が 45%、LQT2 が 35%、LQT3 が 10%とこの 3 型で全体の LQT 症候群の 90%を占めている[3-9, 47-51]。表 1.に LQT 症候群の代表的な分類を示す。

表１. LQT 症候群の代表的な分類

	chromosome	gene	ion channel	ion current	abnormality	frequency
LQT1	11p15.5	KCNQ1	KVLQT1	I_{ks}	loss of function	40%
LQT2	7q35-36	KCNH2	HERG	I_{kr}	loss of function	30-40%
LQT3	3p21-24	SCN5A	hH1	I_{Na}	gain of function	10%
LQT4	4q25-27	ANK2	Ankyrin-B	$I_{Na,K}$	loss of function	?
LQT5	21q22.1-22.2	KCNE1	minK	I_{ks}	loss of function	2-5%
JLN1	11p15.5	KCNQ1	KVLQT1	I_{ks}	loss of function	
JLN2	21q22.1-22.2	KCNE1	minK	I_{ks}	loss of function	

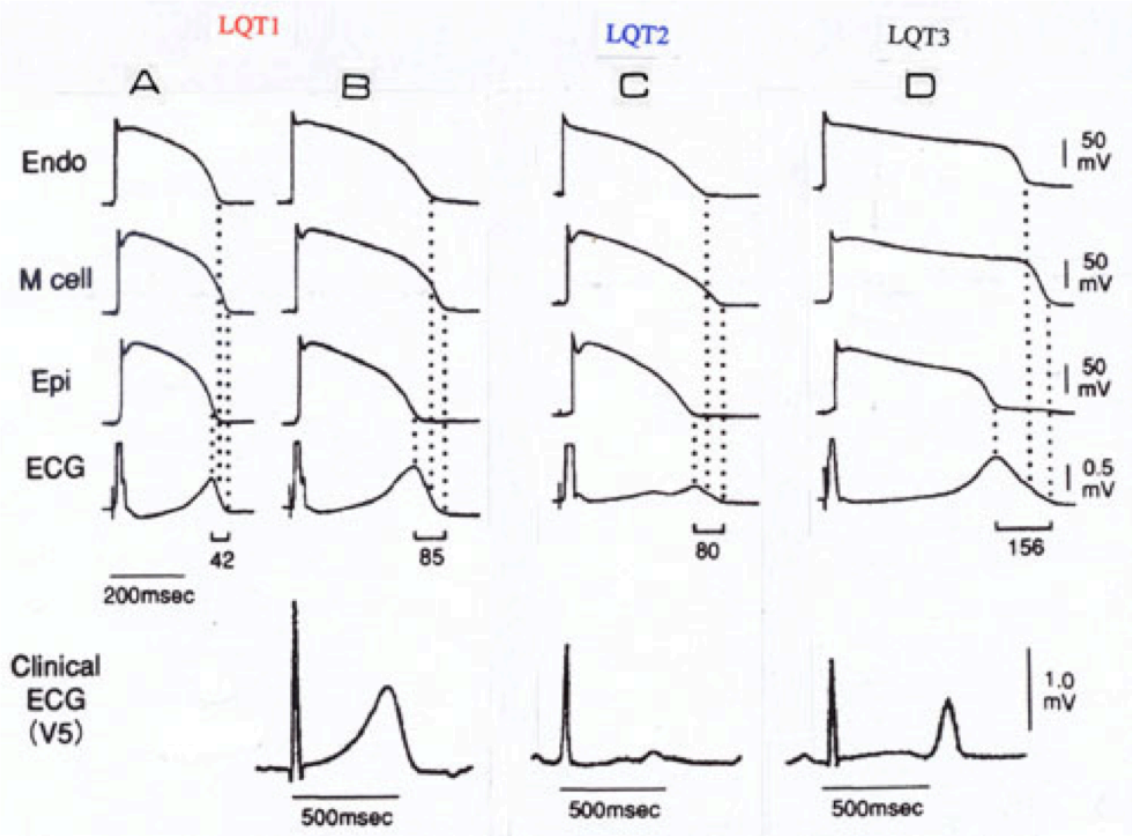
失神や TdP、心室細動など心室性不整脈による心事故の誘因は遺伝子型によって大きく異なり、LQT1 では運動とくに水泳中が多いのに対し、LQT2 では安静・睡眠中と急激な緊張（音刺激）が半数ずつ、そして LQT3 では睡眠・安静時に多いのが特徴である。従って β 遮断薬は LQT1 では 70－80%の例で有効であるのに対して、LQT2 では約 6 割、そして LQT3 では β 遮断薬はあまり有効ではなくむしろ Na チャネルを抑制するメキシレチンが有効である[10-16]。

表 2.に LQT 症候群 1-3 型の主な表現型の特徴を、図 1.に LQT 症候群 1-3 型の安静時標準 12 誘導心電図の特徴を示す。

表 2. LQT1-3 の主な表現型の特徴

	チャネル	発作時間	生活指導	治療薬
LQT1	I_{Ks}	運動(水泳)、情動ストレス	高度の運動制限	βblocker
LQT2	I_{Kr}	音刺激、睡眠からの覚醒	運動制限、音刺激、出産前後	βblocker
LQT3	I_{Na}	安静時、睡眠中	運動制限不要	Na channel blocker

図 1. LQT1-3 の安静時 12 誘導心電図の特徴



このように、それぞれの責任遺伝子により、致死性不整脈発生のメカニズムおよび発作誘因が異なるため、これらの責任遺伝子同定は実臨床の場面で治療方針選択にとって有用な情報となる[16-19]。しかし、時に同一責任遺伝子に重複変異を認めることや、異なる責任遺伝子異常を同一患者に認めることがあり、生活指導を含めた致死性不整脈予防および治療方針決定に苦慮することがある。このような例は LQT 症候群責任遺伝子複合変異 (Compound mutation)と呼称され、単一変異例 (Single mutation)と比較し安静時 12 誘導心電図における QT 時間がより延長し、心イベントが多く、予後不良と報告されている。これまでに LQT1 と LQT２の compound 例の K チャネル電流がそれぞれの単一変異例の K チャネル電流より低下しているという症例報告はあるが、Compound mutation 例の表現型がより重篤である成因については未だ未解明である。

Single mutation 例についてはこれまでにその変異部位が膜貫通領域の例で C-末端や N-末端の例に比し、表現型がより重篤であるという報告がある。Compound mutation 例のより重篤な表現型が変異部位によって規定されているのか、それとも変異が２種類あること自体に起因しているのかという疑問が湧くが、これもいまだ未解明である。

また、これらの compound mutation が小児期から重篤な表現型をもっているのかということについては不明である。以前から QT 延長症候群による乳児期死亡が乳幼児突然死症候群 sudden infant death syndrome (SIDS)の死亡例として報告されているのではないかと考えられていた。最近になって遺伝子診断により SIDS 例の中に占めるＬＱＴ 症候群症例の頻度が実に 10%にものぼるということが、ノルウェーや我が国から報告されている。 これらの中に Compound mutation 例が含まれていたかは不明であるが、小児期から非常に重篤な表現型をもつ LQT 症候群が存在していることは事実である。しかも乳幼児突然死症候群の原因となっている例も多数いるということであるため、LQT 症候群の早期診断および遺伝子診断が非常に重要であり、compound mutation 例を含めたより重症な遺伝型の追求は小児にとって非常に重要な課題であると言える。

そこで本研究の目的は、
①小児期において Compound mutation 例が Single mutation 例よりも重篤な表現型を示すことを証明すること。
②Compound mutation 例の重篤な表現型はそもそも変異部位がより重篤な例であるであることに起因するのか、あるいは変異部位が重篤ではなくとも、Compound であることに起因するのかを明らかにすること。
とした。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

ICD: Implantable Cardioverter-Defibrillator
LQT: Long QT
PCR: Polymerase Chain reaction
Polyphen2: Polymorphism Phenotype2
POS: Possibly damaging
PRB: Probably damaging
QTc: corrected QT
SIFT: Sort Intolerant from Tolerant
TdP: torsade de pointes
TI score: Tolerant index score

実験方法

本研究では以下の 3 点について段階的に研究を行った。

①臨床的に LQT 症候群と診断された小児例のうち、遺伝子検索を行い、遺伝子変異が認められた例についてその表現型を調査し、single mutation 例と compound mutation 例で比較検討すること。

②アミノ酸配列において親水性、疎水性の別と種の保存という観点からその変異部位がどの程度表現型に影響しうるのかという表現型への関与予測をたてる web site がある。これらの web site のうち、これまでに頻用されている Sort Intolerant from Tolerant (SIFT)および Polymorphism Phenotype2 (Polyphen2)を利用し、まずは single mutation 例でこれらの関与予測が実際の表現型を正しく予測しうるか否かを検討すること。

③つぎに、compound mutation 例についても関与予測を行い、その重篤な表現型が変異部位から予測しうるのかどうか検討すること。

その具体的な方法を以下に示す。

①については

まず対象者を Schwart の診断基準により LQT 症候群の臨床的確定診断がなされた小児例とした[21]。全ての対象者はヘルシンキ宣言を基本として、我が国の臨床研究に関する臨床指針に従った東京女子医科大学の遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会により平成２年に承認された遺伝子検査に関する説明同意書に基づいた説明と書面での同意を得て行われた。

図 2.に Schwartz の診断基準を示す。

図 2. Schwartz の LQT 症候群診断基準

基準項目			点数
心電図	QT c	≧480msec	3
		460～470msec	2
		450msce（男性）	1
	Torsade de pointes		2
	T波交互脈		1
	結節性T波（３誘導以上）		1
	徐脈		0.5
臨床症状	ストレスに伴う失神発作		2
	ストレスに伴わない失神発作		1
	先天性聾		０５
家族歴	確実な家族歴		1
	30歳未満での突然死の家族歴		０５
診断確実：点数合計≧４、　疑診：２～３点、 可能性が低い:：＜１点 （Schwartz　PJ et al:Ciruculation　1993;88,782-4）			

対象者の末梢白血球より抽出したゲノム DNA を用いて、各遺伝子の膜貫通領域とポア領域においてプライマーを設計し、PCR (Polymerase Chain reaction)により DNA 断片を増幅させて直接塩基配列決定法(direct sequence)を用いて遺伝子変異の同定を行った。

ゲノム DNA 抽出方法について以下に示す。ヘパリンを抗凝固剤として用いた末梢血 300μl に Lysis Buffer (0.3 M NH_4Cl, 8 mM $NaHCO_3$, 1 mM EDTA)を 4ml 添加した上で、常温で 7 分間転倒混和し溶血した。4℃、1500 g、5 分間遠心した後に、1xPBS (137 mM NaCl, 8.1mM Na_2PO4, 2.7mM KCl, 1.5mM KH2PO4)で 2 回洗浄し、溶血後の細胞ペレットを得た。このペレットに SepaGene (Eidia, Tokyo, Japan)を用いて、添付されているプロトコールに従い DNA を抽出した。

各遺伝子において設計したプライマーの塩基配列を表 3. に示す。尚、SCN5A の Exson 12,17 および 28 は増幅する領域が大きいため複数に分割してプライマーを設計した。

表 3.　KCNQ1, KCNE2, SCN5A プライマーの塩基配列

【KCNQ1】

Exson	Forward Primer (5'–)	Reverse Primer (5'–)
1	GAGGAAGCGCTGGGGTTGG	GGGTCGCAGCTCCGACG
2	ATGGGCAGAGGCCGTGATGCTGAC	ATCCAGCCATGCCCTCAGATGC
3	GTTCAAACAGGTTGCAGGGTCTGA	CTTCCTGGTCTGGAAACCTGG
4	CTCTTCCCTGGGGCCCTGGC	TGCGGGGGAGCTTGTGGCACAG
5	ATTCCCAGGCCCCTGTCG	AGGCTGGGCTCAAGCTTGG
6	TCCTGGAGCCCGACACTGTGTGT	TGTCCTGCCCACTCCTCAGCCT
7	TGGCTGACCACTGTCCCTCT	CCCCAGGACCCCAGCTGTCCAA
8	GCTGGCAGTGGCCTGTGTGGA	AACAGTGACCAAAATGACAGTGAC
9	GACTCTGAGGTCCCAGACCC	TCCCTGACACAGGCTGTACC
10	GCCTGGCAGACGATGTCCA	CAACTGCCTGAGGGGTTCT
11	CTGTCCCCACACTTTCTCCT	TGAGCTCCAGTCCCCTCCAG
12	TGGCCACTCACAATCTCCT	GCCTTGACACCCTCCACTA
13	GGCACAGGGAGGAGAAGTG	CGGCACCGCTGATCATGCA
14	GACAGTCCACTGTCTTGCC	GCCCATTCTGACATCATGGGG
15	CACCCCACTTCCCAAGCC	GCACGTTCACACGCAGACC
16	CACCACTGACTCTCTCGTCT	CCATCCCCCAGCCCCATC

【KCNH2】

Exson	Forward Primer (5'–)	Reverse Primer (5'–)
1	CCAGGAGTCCGGGGCTCG	CCCCATTGACTCGCACTTGC
2	CCAGTCCCAGCCATGCTTCC	TGGTCCCGCCCCTCTTGACC
3	GGGCTATGTCCTCCCACTCT	AGCCTGCCCTAAAGCAAGTACA
4	CCCCTCCTTCCCTTACCC	CCCAGAATGCAGCAAGCCTG
5	CCTGGTCTCTTGAGCTGACCC	TCGCAGCTCTGGAATAGATTGCC
6	CAGAGATGTCATCGCTCCTG	TACACCACCTGCCTCCTTGCTGA
7	TGCCCCATCAACGGAATGTGC	AGTTTCCTCCAACTTGGGTTC
8	GTCAAGGGCGTCTCGTGG	GGCTTCCATTTCCTCATGGG

9	ATGGTGGAGTGGAGTGTGGGTT	AGAAGGCTCGCACCTCTTGAG
10	GAGAGGTGCCTGCTGCCTGG	ACAGCTGGAAGCAGGAGGATG
11	CCTGGGGCAAAATCACATTGG	GGGATGGGAAGGTCTGAGG
12	AAGCGACTGGGGACAAACC	GTAGACGCACCACCGCTGCCA
13	CTCACCCAGCTCTGCTCTCTG	CACCAGGACCTGGACCAGACT
14	GTGGAGGCTGTCACTGGTGT	TTCCTCCAGGAGGACAGGG
15	TGCCCATGCTCTGTGTGTATTG	CGGCCCAGCAGCGCCTTGATC

【SCN5A】

Exson	Forward Primer (5'–)	Reverse Primer (5'–)
1	GCCGCTGAGCCTGCGCCCAGT	GGAAAGTTGGGCGGCGGCAG
2	GGTCTGCCCACCCTGCTCTCT	CCTCTTCCCCCTCTGCTCCATT
3	AGTCCAAGGGCTCTGAGCCAA	GGTACTCAGCAGGTATTAACTGCAA
4	GGTAGCACTGTCCTGGCAGTGAT	CCTGGACTCAAGTCCCCCTTC
5	TCACTCCACGTAAGGAACCTG	ATGTGGACTGCAGGGAGGAAGC
6	CCTTTCCTCCTCTCACTGTCTGT	GGTATTCTGGTGACAGGCACATTC
7	CCACCTCTGGTTGCCTACACTG	GTCTGCGGTCTCACAAAGTCTTC
8	CGAGTGCCCCTCACCAGCATG	GGAGACTCCCCTGGCAGGACAA
9	GGGAGACAAGTCCAGCCCAGCAA	AGCCCACACTTGCTGTCCCTTG
10	ACTTGGAAATGCCCTCACCCAGA	CACCTATAGGCACCATCAGTCAG
11	AAACGTCCGTTCCTCCACTCT	AACCCACAGCTGGGATTACCATT
12	GCCAGTGGCTCAAAAGACAGGCT	CCTGGGCACTGGTCCGGCGCA
	CACCACACATCACTGCTGGTGC	GGAACTGCTGATCAGTTTGGGAGA
13	CCCTTTTCCCCAGCTGACGCAAA	GTCTAAAGCAGGCCAAGACAAATG
14	CAGGAAGGTATTCCAGTTACATATGA	ACCCATGAAGCTGTGCCAGCTGT
15	CTTTCCTATCCCAAACAATACCT	CCCCACCATCCCCCATGCAGT
16	GAGCCAGAGACCTTCACAAGGTCCCCT	CCCTTGCCACTTACCACAAG
17	GGGACTGGATGGCTTGGCATGGT	CGGGGAGTAGGGGGTGGCAATG
	GCCCAGGGCCAGCTGCCCAGCT	CTGTATATGTAGGTGCCTTATACATG
18	AGGGTCTAAACCCCCAGGGTCA	CCCAGCTGGCTTCAGGGACAAA
19	GAGGCCAAAGGCTGCTACTCAG	CCTGTCCCCTCTGGGTGGAACT
20	ACAGGCCCTGAGGTGGGCCTGA	TGACCTGACTTTCCAGCTGGAGA
21	TCCAGGCTTCATGTCCACCTGTCT	TCTCCCGCACCGGCAATGGT

22	AGTGGGGAGCTGTTCCCATCCT	GGACCGCCTCCCACTCC
23	TTGAAAAGGAAATGTGCTCTGGG	AACATCATGGGTGATGGCCAT
24	CTCAAGCGAGGTACAGAATTAAATGA	GGGCTTTCAGATGCAGACACTGAT
25	GCCTGTCTGATCTCCCTGTGTGA	CCTGTCTGGTCTCCCTGTGTCA
26	CCATGCTGGGGCCTCTGAGAAC	GGCTCTGATGGCTGGCCATGTG
27	CCCAGCGAGCACTTTCCATTTG	GCTTCTCCGTCCAGCTGACTTGTA
28	TGCACAGTGATGCTGGCTGGAA	GAAGAGGCACAGCATGCTGTTGG
	AAGTGGGAGGCTGGCATCGAC	GTGCTCTCCTCCGTGGCCACGC
	GAGCCCAGCCGTGGGCATCCT	GTCCCCACTCACCATGGGCAG
	CCAACCAGATAAGCCTCATCAACA	CCGCCTGCTGACGGAAGAGGA
	TGCTGCAACGCTCTTTGAAGCAT	AAAGGCTGCTTTTCAGTGTGTCCT
	GGACCGTGAGTCCATCGTGTGA	AGCCCATTCACAACATATACAGTCT
	CAACTTCATCCCAGCTGCTGAGG	CTCCCAGCATCTCAGGTCAAGTG
	TTCACTGCCCAGGGGTCGAATG	CCAGGCCACTCTCCTCTGGAAG
	TCACTCTGGCCCCCTATTGTCT	GGTCCTGAGAGCCCTGGGAGAT
	GAAGTTCACCAGCCCTGAGCCAT	TAGGATTGTCAGCAGCTGAAG
	CTAGTCCAATCACCCCCAGGA	ATGGGTTGGGTCTGGGGTTGC
	TTTCTTCTTGTCACCCCAGTT	GTAAGCCATTTAATTGGTTTGC

次に上記のプライマーを用いてダイレクトシークエンス解析を行った。

PCR は 1 検体につき総量 20 μl で調整し、鋳型 DNA 50ng/μl 1.0 μl に対して、10x AccuPrime Buffer 2.0 μl、AccuPrime Taq polymerase 0.1 μl (Life Technology, Japan)、10 μM Forward Primer 0.5 μl、10 μM Reverse Primer 0.5 μl に 15.9 μl の dH_20 を添加した。熱変性は初回のみ 94℃ 30 秒、その後 94℃ 20 秒、アニーリングに 63℃ 20 秒、伸長反応に 68℃ 30 秒として 35 サイクル、さらに最終回のみ伸長反応 6 分を追加した。

次に e-Gene (BIO CONCIERGE, USA)を使用し、電気泳動で目的の band を確認した。PCR 産物は Wizard PCR Preps DNA purification system (Promega, Madison, WI) にて精製し、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を利用して、ダイレクトシークエンス法で ABI3130 シークエンサー (Applied Biosystems)にてシークエンス解析を行った。

次に対象者の表現型について、診断時の QT 時間、診断時年齢、心イベントの有無、イベント発症年齢を調査した。Single mutation 例と Double mutation 例の表現型をカプランマイヤー曲線で比較検討した。LQT 症候群における心イベントを失神、心室頻拍あるいは心室細動、植え込み型除細動器 (Implantable Cardioverter-Defibrillator; ICD)施行、突然死と定義した。

②については、

①で遺伝子変異を認めた例のうち、single mutation 例について、SIFT および Polyphen2 を利用して変異部位により表現型への関与予測をたて、実際の表現型と比較し、関与予測がどの程度妥当であるのかを検討した。

ここで、SIFT および Polyphen2 について説明を加える。
SIFT (SIFT,jcvi.org/)の基本概念はアミノ酸配列保存性である。つまり、同じタンパクファミリーの中で、保存性の高いアミノ酸配列中の変異・置換が蛋白質機能の変化という点で致命的なため、Damaging と予測する。一方、保存性の低いアミノ酸配列中での変異・置換は Tolerant と予測するものである。配列保存性を 0.00-1.00 の間で Tolerant Index (TI) score として数値化し、0.05 以下を Damaging と予測するツールである。

Polyphen2 (genetics.bwh.harvard.edu/pph2/)は他の生物種とのホモログの配列情報から、変異があった箇所の配列保存性、科学的な特徴、タンパク質構造やドメイン情報をもとに、この変異がタンパク質の機能に及ぼす影響を数値化し、Probably damaging、Possibly damaging、Benign の三段階で予測するツールである[22]。

尚、２種のツールで関与予測を行う際に必要な Protein ENSP ID は
Ensembl Genome Browser (www.ensembl.org/) により得た。

③については、

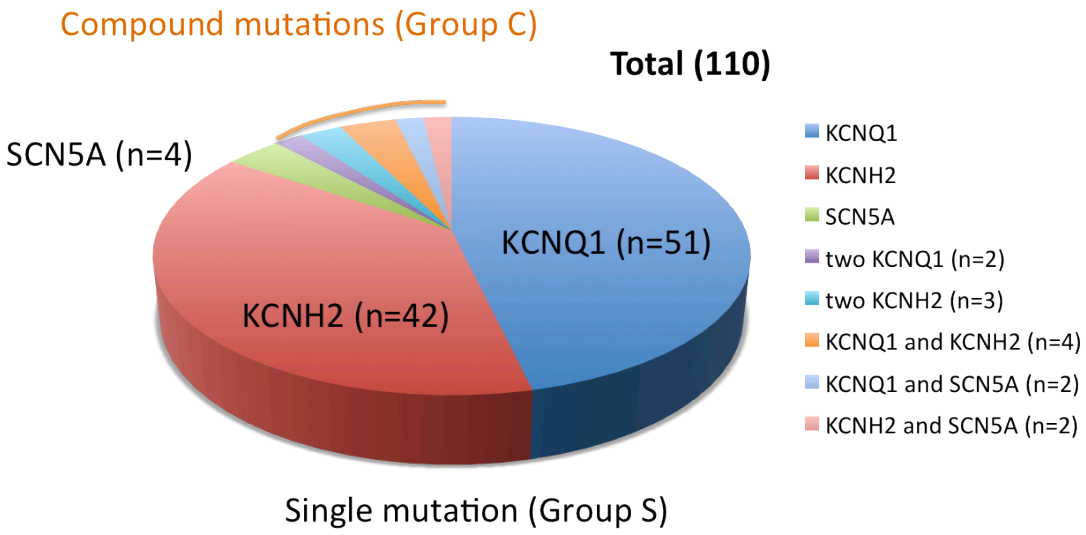
②と同様に、Compound mutation 例についても SIFT、Polyphen2 を用いて２種の遺伝子変異について、それぞれ表現型への関与予測を集計した。

実験結果

当施設(東京女子医科大学心臓血圧研究所)では1998年4月から2012年6月までに臨床的にLQT症候群と確定診断された患者383例について遺伝子検査を行ってきた。結果、何らかの遺伝子変異を認めたのは148例(39%)で変異総数は165個、その内訳はKCNQ1 66例、KCNH2 63例、SCN5A 34例、KCNE1 1例、KCNE2 0例であった。このうち、20歳未満の小児例であって、上記の表現型が追跡可能であった110例、変異総数123個を本研究の対象者とした。

図3. に示したようにSingle mutation(S群)は97例でKCNQ1変異51例、KVNH2変異42例とSCN5A変異4例であり、これは先に示したLQT症候群の疫学的な型別頻度とほぼ同等の割合で分布していた。Compound mutation例 (C群)は13例で、その内訳はKCNQ1-KCNQ1 2例、KCNH2-KCNH2 3例、KCNQ1-KCNH2 4例、KCNQ1-SCN5A 2例、KCNH2-SCN5A 2例であった。

図 3


Compound mutations (Group C)
Total (110)
SCN5A (n=4)
KCNQ1 (n=51)
KCNH2 (n=42)
KCNQ1
KCNH2
SCN5A
two KCNQ1 (n=2)
two KCNH2 (n=3)
KCNQ1 and KCNH2 (n=4)
KCNQ1 and SCN5A (n=2)
KCNH2 and SCN5A (n=2)
Single mutation (Group S)

結果①

これら 110 例の表現型について診断時年齢、追跡機間、QTc 時間、失神出現年齢を表 4.に示し、心イベントの各カプランマイヤー曲線を図 4 ア.〜エ.に示した。

表 4.

	S 群	C 群	P 値*
診断時年齢中央値(年)	9.4	8.1	NS
平均観察期間 (年)	18.6	17.8	NS
QTc 時間中央値 (msec)	490	540	0.007
失神出現時年齢中央値 (年)	10	5	NS

*P 値は Mann Whitney's *U* test を用いて算出した。

表 4.によると、診断時年齢中央値は S 群で 9.4 年、C 群で 8.1 年、平均観察期間は S 群で 18.6 年、C 群で 8.1 年、失神出現時年齢中央値は S 群で 10 年、C 群で 5 年といずれも有意差を認めなかった。しかし、QTc 時間中央値は S 群で 490 msec、C 群で 540msec と有意に C 群で QTc 時間が延長していた。

図 4 ア． 無失神率

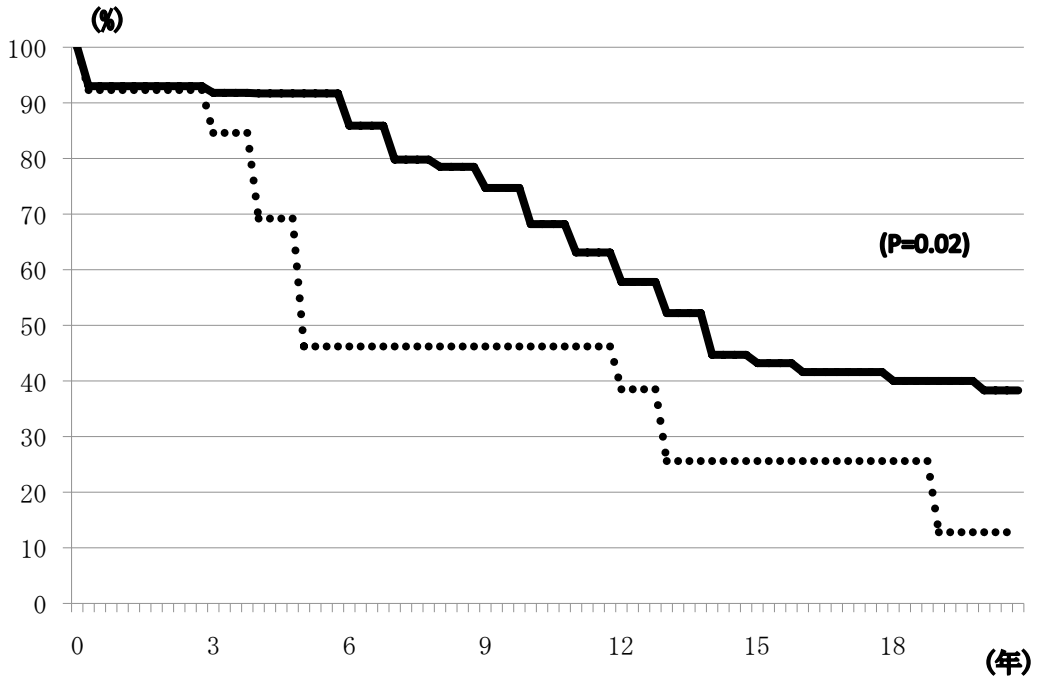


図 4 イ． ICD 回避率

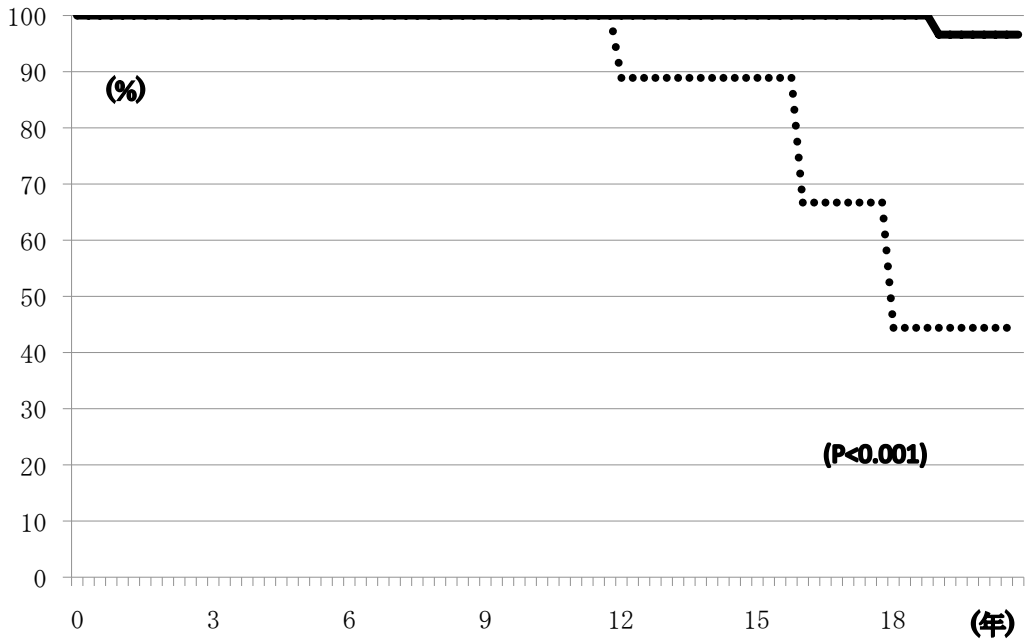


図 4 ウ． 生存率

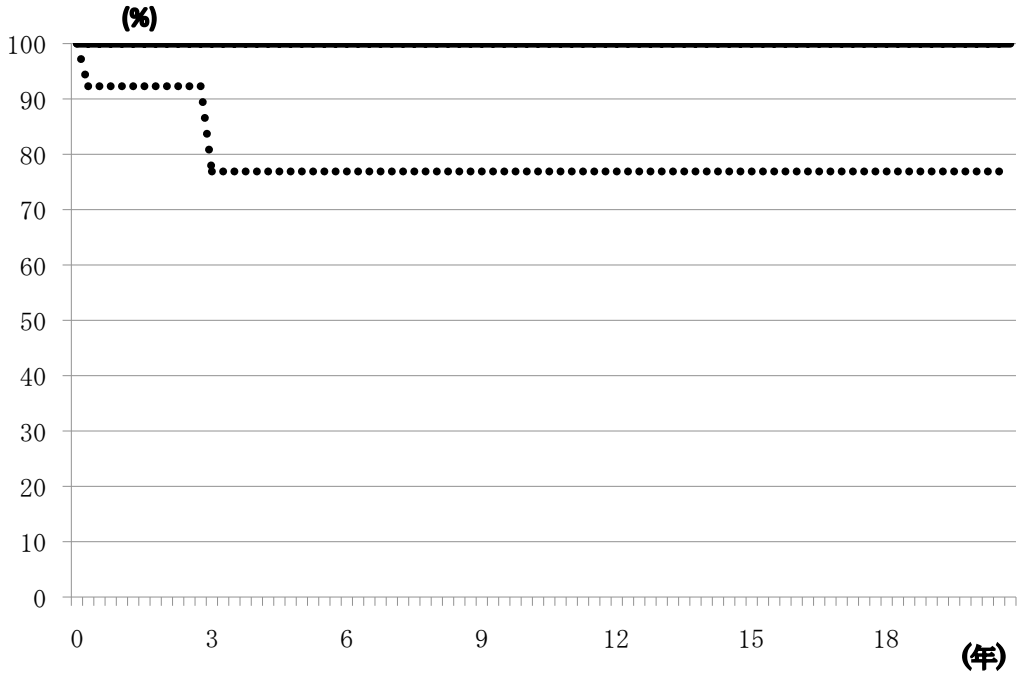


図 4 エ.　ICD・死亡回避率

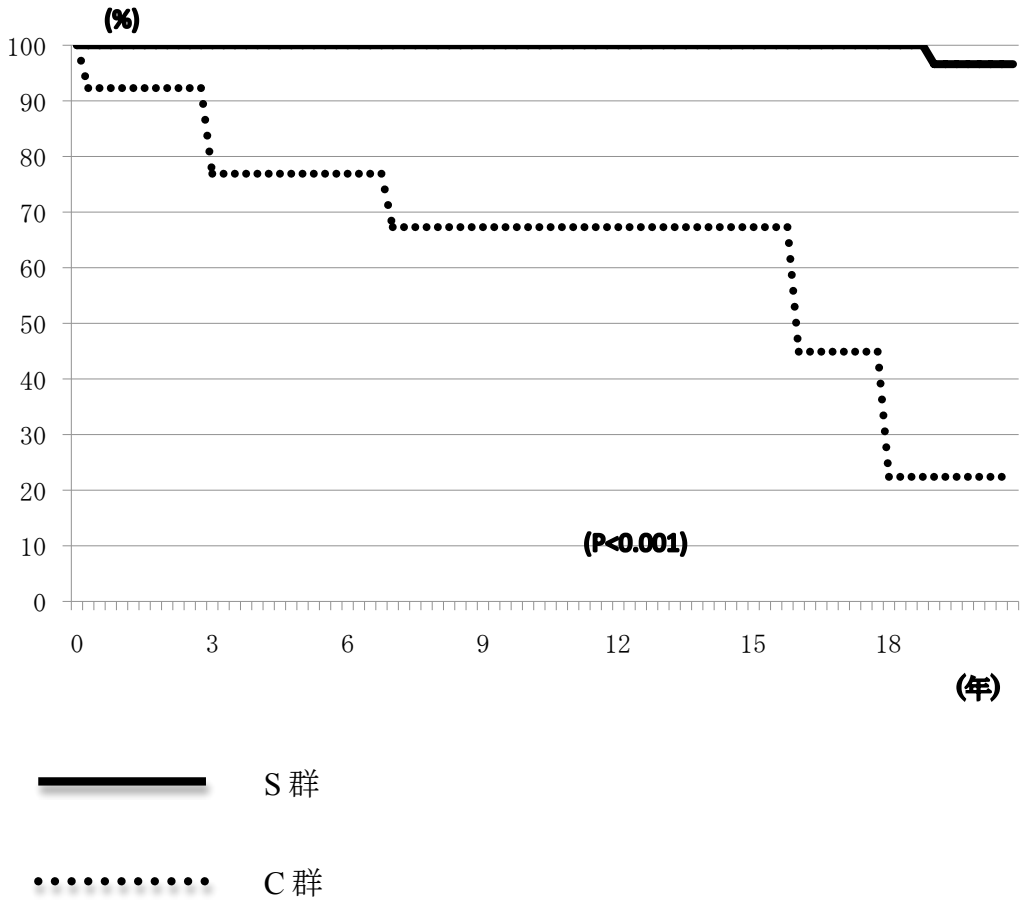


図4ア. のように5、10、15年後の無失神率はS群でそれぞれ91%、68%、43%であった。対してC群では46%、39%、25%であり、有意にC群が劣っていた。
図4イ. のように5、10、15年後のICD回避率はS群でそれぞれ100%、100%、97%であった。対してC群では100%、89%、44%であり、有意にC群が劣っていた。
図4ウ. のようにS群では20年間突然死例はなかったが、C群の生存率は5年、10年ともに77%であった。

結果②

SIFT および Polyphen2 による変異部位からみた S 群の表現型関与予測を表 5 に示す。これら 2 種の関与予測ツールの特性から、欠失・挿入・フレームシフト変異は対象から除外した。また、観察期間が 1 年に満たない例を観察不十分例として除外したところ、対象は 66 例であった。
SIFT および Polyphen2 それぞれに予測結果の集計を表 6 ア、イに示した。

尚、すべての変異は 1000 Genomes (1000genomes.org/)と Ensembl Genome Browser (www.ensembl.org/) により一塩基多型としての報告がないことを確認している。
加えて、*印をつけた変異は The Human Gene Mutation Database (www.hgmd.org/) での検索によるとこれまでに未報告の変異である。

表 5.　SIFT と Polyphen2 による S 群の表現型関与予測

	変異	表現型	SIFT		Polyphen 2	
			予測	スコア	予測	スコア
KCNQ1	A341V	ICD	Damaging	0	PRB	1.000
	E261L	Syncope	Damaging	0	PRB	1.000
	R594Q	None	Damaging	0	PRB	0.990
	R594Q	None	Damaging	0	PRB	0.990
	R594Q	None	Damaging	0	PRB	0.990
	R594Q	None	Damaging	0	PRB	0.990
	V254M	Syncope	Damaging	0	PRB	1.000
	A341V	Syncope	Damaging	0	PRB	1.000
	A341V	Syncope	Damaging	0	PRB	1.000
	L353P	Syncope	Damaging	0	PRB	0.996
	L353P	Syncope	Damaging	0	PRB	0.996
	A341V	Syncope	Damaging	0	PRB	1.000
	A341V	None	Damaging	0	PRB	1.000
	A341V	Syncope	Damaging	0	PRB	1.000
	A341V	None	Damaging	0	PRB	1.000
	A341V	Syncope	Damaging	0	PRB	1.000
	A341V	Syncope	Damaging	0	PRB	1.000
	I313K*	Syncope	Damaging	0	PRB	1.000
	I313K*	Syncope	Damaging	0	PRB	1.000
	I313K*	None	Damaging	0	PRB	1.000
	N586D	None	Tolerant	0.46	POS	0.952
	S277L	None	Damaging	0	PRB	1.000
	W379C*	Syncope	Damaging	0	PRB	1.000
	G568E*	Syncope	Damaging	0	PRB	1.000
	D242N	None	Damaging	0	PRB	1.000
	S95G	None	Tolerant	0.7	Benign	0.007
	I567T	None	Damaging	0	POS	0.706
	I567T	None	Damaging	0	POS	0.706
	Y315C	None	Damaging	0	PRB	1.000
	Y315C	Syncope	Damaging	0	PRB	1.000

	Y315C	Syncope	Damaging	0	PRB	1.000
	A341V	Syncope	Damaging	0	PRB	1.000
	G314S	Syncope	Damaging	0	PRB	1.000
	L342F	Syncope	Damaging	0	PRB	1.000
KCNH2	A85V	Syncope	Damaging	0.01	POS	0.907
	R20G	Syncope	Damaging	0	Benign	0.254
	F29L	None	Damaging	0	Benign	0.000
	F29L	None	Damaging	0	Benign	0.000
	F29L	None	Damaging	0	Benign	0.000
	F29L	None	Damaging	0	Benign	0.000
	Q81R	None	Tolerant	0.59	Benign	0.037
	C66S*	None	Damaging	0	PRB	1.000
	C66S*	Syncope	Damaging	0	PRB	1.000
	G53S	Syncope	Damaging	0.01	POS	0.935
	C66G	None	Damaging	0	PRB	1.000
	C66G	None	Damaging	0	PRB	1.000
	N633S	Syncope	Damaging	0.01	POS	0.873
	W563R*	Syncope	Damaging	0	PRB	0.970
	T634I	None	Damaging	0	PRB	1.000
	A561T	Syncope	Damaging	0	PRB	1.000
	H562R	None	Damaging	0	PRB	0.998
	R823W	None	Damaging	0	PRB	1.000
	R823W	None	Damaging	0	PRB	1.000
	G628V	Syncope	Damaging	0	PRB	1.000
	G628S	Syncope	Damaging	0	PRB	1.000
	A561V	Syncope	Damaging	0	PRB	1.000
	G572D	Syncope	Damaging	0	PRB	0.998
	G628D*	Syncope	Damaging	0	PRB	0.999
	R823W	None	Damaging	0	PRB	1.000
	N629S	Syncope	Damaging	0	PRB	0.995
	R534C	ICD	Damaging	0	PRB	1.000
	R534C	Syncope	Damaging	0	PRB	1.000

SCN5A	V1763M	Syncope	Damaging	0	PRB	0.969
	E1784K*	None	Damaging	0	Benign	0.248
	R1623Q	Syncope	Damaging	0	Benign	0.004
	L1988R	None	Tolerant	0.17	Benign	0.075

PRB: Probably damaging

POS: Possibly damaging

表 6 ア． **SIFT** による **S** 群の表現型関与予測のまとめ

S 群	表現型		
予測結果	無症状	失神	ICD あるいは突然死
Most damaging (人) (TI score, 0.00)	25	32	2
Damaging (人) (TI score, 0.01–0.05)	0	3	0
Tolerant (人) (Tiscore, 0.06–1.00)	4	0	0

表 6 イ． **Polyphen2** による **S** 群の表現型関与予測

S 群	表現型		
予測結果	無症状	失神	ICD あるいは突然死
Probably damaging (人)	18	30	2
Possibly damaging (人)	3	3	0
Benign (人)	8	2	0

表 6 によると、重篤な ICD 例 2 例は SIFT では Most damaging、Polyphen2 では Probably damaging と予測されており、結果に対して正しく予測が可能であった。一方、SIFT での関与予測が Tolerant であった 4 例はすべて無症状であったが、Polyphen2 で benign と予測された 10 例のうち、8 例は無症状であったが、2 例は失神していた。ここで、SIFT における damaging と Polyphen2 における Possibly damaging の期待される位置づけとしては、重篤例がなく、失神例と無症状例が 1 対 1 の比率で存在することになる。Polyphen2 における Possibly damaging の 6 例は無症状 3 例、失神 3 例であったが、SIFT における damaging の 3 例は全例失神していた。以上のように、本研究対象者に対する 2 種のツールによる表現型への関与予測結果は、実際の表現型を概ね正しく予測し得ていたが、SIFT による damaging の予測と Polyphen2 による benign の予測であった例で、実際の表現型を予測し得ていない例が含まれていた。

そこで、あらたな試みとしてこれら 2 種の関与予測結果を集計し、
連関予測を行った。

表 7 ア.

Polyphen2 予測結果	SIFT 予測結果とスコア		
	Most Damaging (TI score, 0.00)	Damaging (TI score, 0.01–0.05)	Tolerant (TI score, 0.06–1.00)
Probably damaging (人)	50	0	0
Possibly damaging (人)	2	3	1
Benign (人)	7	0	3

表 7 イ. 連関予測の定義

Polyphen2 予測結果	SIFT 予測結果とスコア		
	Most Damaging (TI score, 0.00)	Damaging (TI score, 0.01–0.05)	Tolerant (TI score, 0.06–1.00)
Probably damaging	A	A	B
Possibly damaging	A	B	C
Benign	B	C	C

表 7 ウ. 連関予測による S 群の表現型関与予測結果

連結予測結果	表現型		
	無症状	失神	ICD あるいは突然死
A	20	30	2
B	5	5	0
C	4	0	0

まず表 7 ア. のように S 群について 2 種のツールによる表現型関与予測結果を集計し、表 7 イ. のように連関予測による予測結果を定義すると、S 群は表 7 ウ. のように予測された。このように連関予測を行うことにより、SIFT による damaging の予測と Polyphen2 による benign の予測であった例の問題点は解消された。この連関予測において予測結果 A の陽性的中率は （予測結果 A の有症状者数)÷(予測結果 A の有症状者数＋無症状者数) = 32 ÷52 = 61.5%であり、SIFT における Most damaging の陽性的中率は57.6%、Polyphen2 における Probably damaging の陽性的中率は64%であった。一方、連関予測結果 C の陰性的中率は 100%、SIFT の Tolerant は 100%、Polyphen2 の Benign は 80%であった。実臨床の場でしばしば問題となりうるのは、低い陰性的中率ということになるため、2 つのツールを連関させることでより妥当な予測を行いうることがわかった。

結果③

SIFT および Polyphen2 による変異部位からみた C 群の表現型関与予測を表 8 に示す。尚、結果②と同様の事由により除外例があり、対象は 10 例であった。

尚、S 群で示したと同様に、すべての変異は 1000 Genomes (1000genomes.org/)と Ensembl Genome Browser (www.ensembl.org/) により一塩基多型としての報告がないことを確認している。
加えて、*印をつけた変異は The Human Gene Mutation Databese (www.hgmd.org/) での検索によるとこれまでに未報告の変異である。

また、Compound mutation 例それぞれ 2 種の変異が、同一アレルの塩基置換であるか、あるいは異なるアレルの塩基置換であるかということについては今回、調査できていない。

表 8.　SIFT と Polyphen2 による C 群の表現型関与予測

No.	遺伝子	変異	表現型	SIFT		Polyphen 2		連関
				予測結果	スコア	予測結果	スコア	予測結果
1	KCNQ1	G246T*	Syncope	Damaging	0	PRB	0.983	A
	KCNH2	I489T*		Damaging	0	PRB	1.000	A
2	KCNQ1	G246T*	None	Damaging	0	PRB	0.983	A
	KCNH2	I489T*		Damaging	0	PRB	1.000	A
3	KCNQ1	G246T*	Syncope	Damaging	0	PRB	0.983	A
	KCNH2	I489T*		Damaging	0	PRB	1.000	A
4	KCNQ1	G246T*	ICD	Damaging	0	PRB	0.983	A
	KCNH2	I489T*		Damaging	0	PRB	1.000	A
5	KCNQ1	Y111C	None	Damaging	0	PRB	1.000	A
	SCN5A	L1988R		Tolerant	0.17	Benign	0.075	C
6	KCNH2	D411Y*	ICD	Damaging	0	PRB	1.000	A
	SCN5A	L1988R		Tolerant	0.17	Benign	0.075	C
7	KCNH2	E50K	Death	Tolerant	0.35	Benign	0.010	C
	KCNH2	N633K*		Damaging	0	POS	0.887	A
8	KCNQ1	L602P*	Death	Damaging	0	POS	0.947	A
	KCNH2	Y611D		Tolerant	1	PRB	1.000	B
9	KCNH2	A614V	Syncope	Damaging	0	PRB	1.000	A
	SCN5A	G709V		Tolerant	0.8	Benign	0.045	C
10	KCNH2	H492Y	ICD	Damaging	0	PRB	0.997	A
	KCNH2	E788K		Damaging	0	PRB	1.000	A

連関予想の組み合わせは A-A 5 例、A-B 1 例、A-C 4 例であり、その表現型は A-A 例は ICD2 例、失神 2 例、無症状 1 例、A-B 例は突然死、A-C 例は突然死、ICD、失神、無症状が各 1 例ずつであった。この結果は変異部位による表現型予測を行う SIFT、Polyphen2 を連関させた連関予測では予測し得ない結果であった。

考察

これまでcompound mutation例はsingle mutationに対してQT時間がより延長し、心イベントが多いと報告されてきた[23-30]。 しかし、ICDを必要とする例や、突然死を起こす例などの重篤な例の心イベント出現時期についてはこれまで明らかにはされていなかった。

本研究ではCompound mutation例がsingle mutation例に比し、10歳までに失神を経験する例が多く、20歳までにICD植え込みを要する率が高い、死亡例も多く、5歳までの死亡率が極めて高いことを示した。乳幼児突然師症候群例の中には、実に10%の頻度でLQT症候群例が含まれているとされている。今回の対象者内にも、乳幼児期に死亡している例が1例含まれており、この例はcompound mutation例であった。

KNNQ1およびKCNH2のcompound mutation例においてKチャネル電流を測定することによりKチャネル遺伝子の付加的機能喪失が確認され、このことを重篤な表現型の原因とする症例報告がある。また、変異部位の表現型への関与を報告する文献もある[6-11]。これらの報告ではKCNQ1およびKCNH2においては変異部位がアミノ酸配列のC末端やN末端に存在する変異に比べ、膜貫通領域に存在する変異で表現型がより重篤であるとしている[12, 13]。SCN5Aについては変異部位の表現型への関与についてはまとまった報告はない。
図5.ア-ウにKCNQ1、KCNH2、SCN5Aの各サブユニットの構造を示す。

図 5 ア. KCNQ1 がコードする K チャネルのサブユニット構造

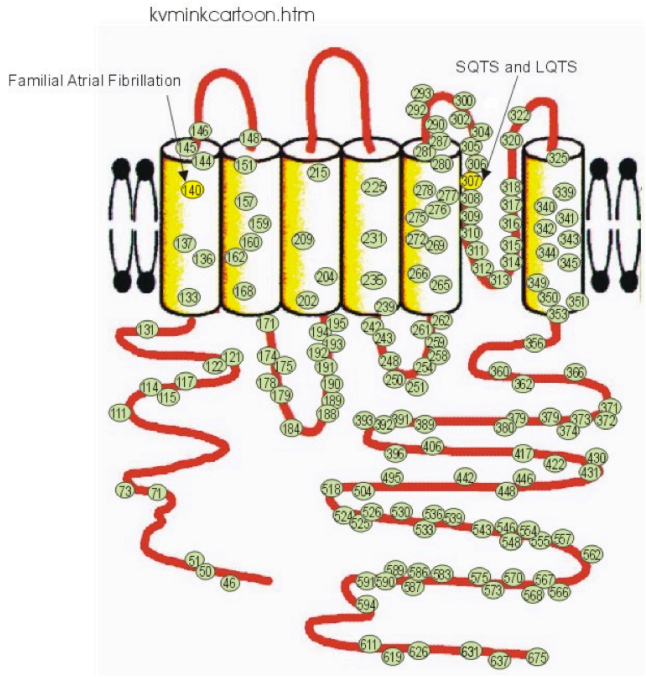


図 5 イ. KCNH2 がコードする K チャネルのサブユニット構造

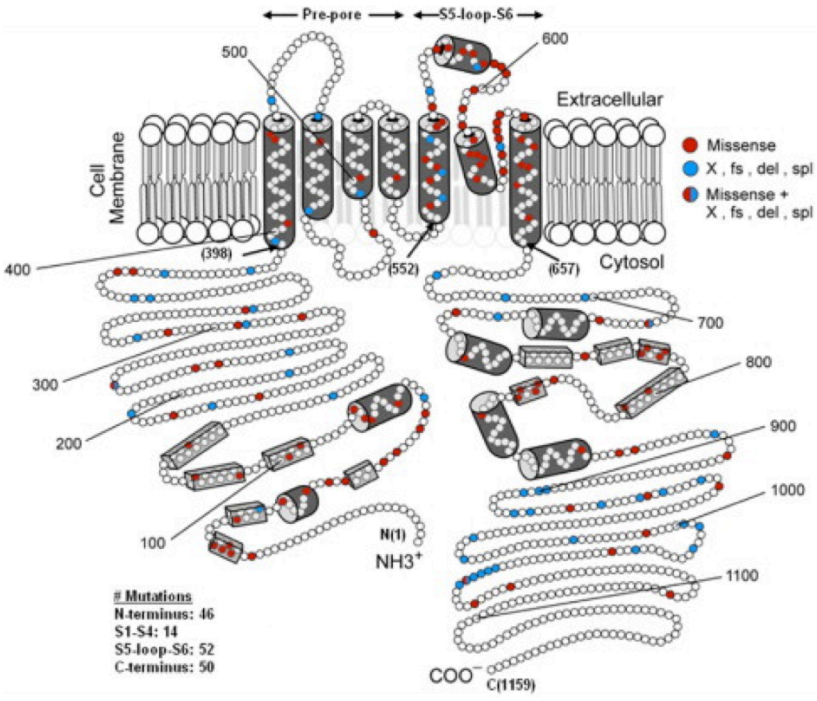
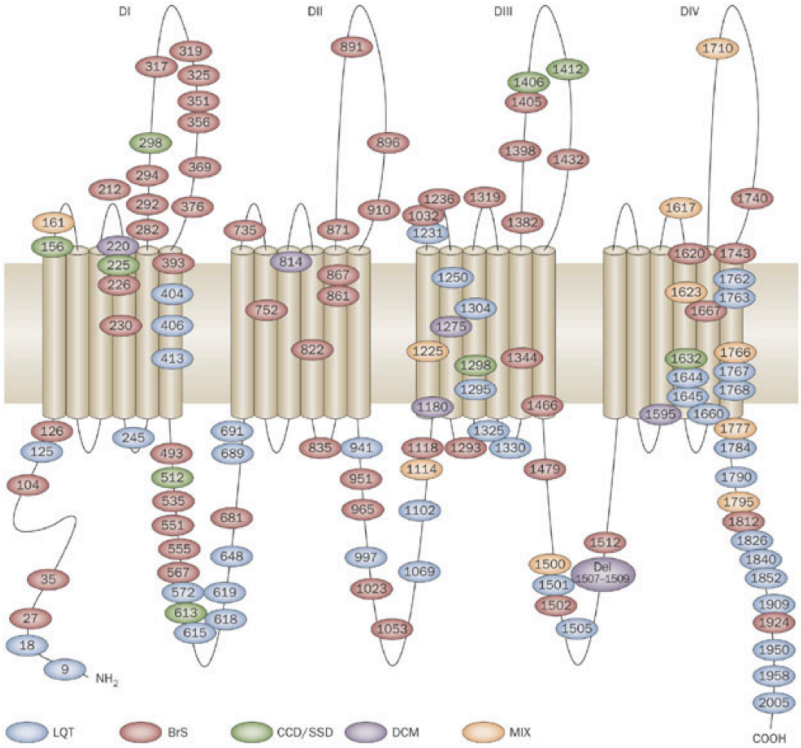


図 5 イ. KCNH2 がコードする K チャネルのサブユニット構造



しかしながら、表現型の重症度を評価する際に膜貫通領域あるいは C 末端、N 末端といったおおまかな変異部位別の予測のみでは不十分である。臨床的に最も重要なことはアミノ酸配列の中での詳細な変異部位が表現型にいかに関与しているかを簡便な方法で予測することである。原因遺伝子が異なれば発作誘発誘因や発作予防薬も異なるため、とりわけ compound mutation 例については生活指導や薬物治療を考慮する際に原因遺伝子別の治療方針決定に苦慮する。2 種の異なる責任遺伝伊変異による LQT 例の診療において、いずれかの責任遺伝子変異が表現型に対して優位性をもっているとすれば、これを予測できれば非常に有用な情報となる。

このためにはおそらくそれぞれの compound mutation 例について遺伝子変異導入細胞を作成し、電流特性測定によって機能評価を行う必要があるが、実臨床ではより簡便に重症度を予測可能な方法が望ましい。

そこで、インターネット上で変異部位のアミノ酸配列保存性やタンパク立体構造上の親・疎水性の別を元に表現型への関与予測を行うことが可能な 2 種のツール (SIFT、Polyphen2)を用いて、LQT 遺伝子変異例の表現型を予測しうるかという点について調査した。

Single mutation 例についてはこれら 2 種の関与予測ツールは有用であった。特に 2 種のツールを連関させた連関予測をたてることにより、より正確な予測を立てることが可能であることがわかった。遺伝子型、性別、年齢、QT 時間、他の安静時 12 誘導心電図上の特徴等に加えて、これらの関与予測ツールが実臨床で果たす役割は大きいものと思われる。

しかしながら、連関予測を含めたこれらの関与予測ツールは小児期から非常に重篤な表現型を示す compound mutaion 例についてはその表現型を予測し得なかった。このことは、compound mutation 例の重篤な表現型が変異部位のアミノ酸配列保存性やタンパク立体構造上の親・疎水性の別といった観点のみからは説明し得ないことを意味している。

ただし、本研究の制限は以下の 2 点である。

- 110 例の各責任遺伝子の頻度が LQT 症候群の疫学と同等であるとはいえ、対象人数が限られたものであること。
- 関与予測を行う際に除外例があること。

総括および結論

①本研究全体から得られた新知見

- LQT 症候群において小児期の compound mutation 例は single mutation 例に比し、10 歳までに失神を経験する例が多く、20 歳までに ICD 植え込みを要する率が高い。また、死亡例も多く、5 歳までの死亡率が極めて高い。
- LQT 症候群 Compound mutation 例が小児期から重篤な表現型をもっている。
- single mutation 例については、実臨床において遺伝子変異が判明した際に、インターネット上で簡便に表現型の関与予測を行うことが可能であることを示した最初の報告である。
- 一方、compound mutation 例について、これらの関与予測が不能であったことは、compound mutation 例の重篤な表現型が変異部位のみを原因としているのではなく、遺伝子変異が複合していることに起因している可能性がある。
- また、single mutation 例、compound mutation 例両者において、これまでに未報告の塩基置換であって、一塩基多型でもない多数の未報告変異例を示した。

②新知見の意義

- LQT 症候群の compound mutation 例はハイリスク群として、心イベント予防のための薬物療法、非薬物療法のガイドラインを single mutation 例とは別に再考する必要性を示している。
- LQT 症候群の遺伝子診断がなされた際には、その表現型を予測するため、実臨床において SIFT や PolyPhen2 を利用することにより、single mutation 例については管理方針決定に有用な情報となる。

③本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開されうるか

LQT 症候群 compound mutation 例の中でも、同一患者に異なる責任遺伝子の変異が重複する場合、臨床的には生活指導や薬物治療の選択に苦慮する。つまり KCNQ1 や KCNH2 など K チャネルをコードする遺伝子と、SCN5A のように Na チャネルをコードする遺伝子の重複変異例には、臨床上非常に悩ましい例ということになる。

本研究の対象者の中にも同一患者に異なる２つの責任遺伝子領域の変異を認める貴重な例がいた。このような重複変異例に関して、それぞれの責任遺伝子変異について部位特定突然変異導入法を用いて変異型 cDNA を合成し、これまで K チャネルの電流特性測定のために広く使用されている HEK-293 細胞にこの変異

型 cDNA を導入することができれば、HEK-293 細胞膜に発現した膜電流を 2 本の電極を用いた電位固定法で記録し、電気生理学的に検討することが可能ではないかと推測している。

④今後の課題

今後、各責任遺伝子の電流特性を機能解析することにより、その詳細が明らかになる可能性があり、データの蓄積が望まれる。

現在、③に示したように同一患者に異なる 2 つの責任遺伝子領域の変異を認める貴重な重複変異例に関して、それぞれの責任遺伝子変異について変異型 cDNA 合成までは完了している。しかし、HEK-293 細胞への変異導入に難渋している。リポフェクション法による一過性発現法で導入を試みているが、共焦点顕微鏡による観察ではチャネルが細胞膜に発現していない変異が存在している。作製したコンストラクトの問題、変異導入そのものが in vitro では不可能な変異である可能性について検討中である。また導入方法の確認作業およびノックアウトマウスの使用検討を行っている。

謝辞

本研究を行うにあたり、遺伝子診断の基本概念や手技をご指導いただいた東京女子医大心臓血圧研究所の羽山 恵美子氏、島田　光代氏、古谷　嘉幸先生、古谷　道子先生、西澤　勉先生、松岡　留美子先生と研究計画から論文作成まで御指導・御校閲いただいた同研究所循環器小児科の中西　敏雄先生、稲井　慶先生に深甚なる感謝の意を評します。

また東京女子医大心臓血圧研究所での研究業務をご支援いただいたことを含め、研究遂行に際してご尽力いただきました北海道大学医学部小児科　有賀　正教授、上野　倫彦先生、武田　充人先生および多くの協力・助言をいただきました北海道大学小児科循環器グループの諸先生方に心より御礼申し上げます。

引用文献

1. Ilan Goldenberg, Arthur J. Moss: Long QT syndrome. JACC 2008: 51; 2291-2300
2. Peter J. Schwartz, et al.: Genotype-Phenotype Correlation in the Long-QT Syndrome : Gene-Specific Triggers for Life-Threatening Arrhythmias. Circulation. 2001: 103; 89-95
3. Roden DM, et al, for the SADS Foundation: Task Force on LQTS. Multiple mechanisms in the long-QT syndrome: current knowledge, gaps, and future directions. Circulation. 1996; 94:1996 –2012.
4. Priori SG, et al: Genetic and molecular basis of cardiac arrhythmias: impact on clinical management. Parts I and II Circulation. 1999; 99: 518-528; part III Circulation. 1999; 99: 674 – 681 and Eur Heart J. 1999; 20: 174-195. 3. Schwartz PJ, Periti M, Malliani A. The long Q-T syndrome. Am Heart J. 1975; 89: 378-390.
5. Schwartz PJ. Idiopathic long QT syndrome: progress and questions. Am Heart J. 1985; 109: 399-411.
6. Zareba W, Moss AJ, Schwartz PJ, et al, for the International Long-QT Syndrome Registry Research Group. Influence of the genotype on the clinical course of the long QT syndrome. N Engl J Med. 1998; 339: 960-965.

7. Schwartz PJ, Priori SG, Napolitano C: The long QT syndrome. In: Zipes DP, Jalife J, eds. Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside. 3rd ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders; 2000:597–615.

8. Schwartz PJ, et al: Long QT syndrome patients with mutations on the SCN5A and HERG genes have differential responses to Na channel blockade and to increases in heart rate: implications for gene-specific therapy. Circulation. 1995; 92: 3381-3386.

9. Moss AJ, et al: Comparison of clinical and genetic variables of cardiac events associated with loud noise versus swimming among subjects with the long QT syndrome. Am J Cardiol. 1999; 84: 876-879.

10. Moss AJ, et al: Effectiveness and limitations of β-blocker therapy in congenital long QT syndrome. Circulation. 2000; 101: 616-623.

11. Locati EH, t al: Age- and sex-related differences in clinical manifestations in patients with congenital long QT syndrome: findings from the International LQTS Registry. Circulation. 1998; 97: 2237–2244.

12. Priori SG, et al: Differential response to Na channel blockade, β-adrenergic stimulation, and rapid pacing in a cellular model mimicking the SCN5A and

HERG defects present in the long QT syndrome. Circ Res. 1996; 78: 1009 -1015.

13. Stramba-Badiale M, et al: Gene-specific differences in the circadian variation of ventricular repolarization in the long QT syndrome: a key to sudden death during sleep? Ital Heart J. 2000; 1: 323-328.
14. Shimizu W, Antzelevitch C: Cellular basis for the ECG features of the LQT1 form of the long QT syndrome: effects of β-adrenergic agonists and antagonists and sodium channels blockers on transmural dispersion of repolarization and torsade de pointes. Circulation. 1998; 98: 2314-2322.
15. Moss AJ, et al: ECG T-wave patterns in genetically distinct forms of the hereditary long QT syndrome. Circulation. 1995; 92: 2929-2934.
16. Schwartz PJ, et al: Stress and sudden death: the case of the long QT syndrome. Circulation. 1991; 83 (suppl II): II-71–II-80.
17. Schwartz PJ, et al. Left cardiac sympathetic denervation in the therapy of congenital long QT syndrome: a worldwide report. Circulation. 1991; 84: 503–511.

18. Schwartz PJ, Stone HL: Effects of unilateral stellectomy upon cardiac performance during exercise in dogs. Circ Res. 1979; 44: 637–645.

19. Wilde AAM, et al. Auditory stimuli as a trigger for arrhythmic events differentiate HERG-related (LQTS2) patients from KvLQT1-related patients (LQTS1). J Am Coll Cardiol.1999;33:327–332.

20. Silvia G. Priori, et al: Risk stratification in the Long-QT syndrome. N ENGL J MED 2003: 348; 1866-74

21. P J Schwartz, A J, G M Vincent and R S Crampton: Diagnostic criteria for the long QT syndrome. An update. Circulation. 1993; 88: 782-784

22. Melissa M J, John H. and Chu C: Screening for deleterious nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms in genes involved in steroid hormone metabolism and response.

23. Peter Westenskow, et al: Compound Mutations: A Common Cause of Severe Long-QT Syndrome. Circulation. 2004: 109; 1834-1841

24. Rong-Rong Wang, et al: Novel compound heteroxygous mutations T2C and 1149insT in the KCNQ1gene cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. International J of Molecular medicine 2011: 28; 41-46

25. Fodstad H, et al: Molecular characterization of two founder mutations causing long QT syndrome and identification of compound heterozygous patients. Ann Med 2006: 38(4): 294-304

26. Grunnet M, et al: Functional assessment of compound mutations in the KCNQ1 and KCNH2 genes associated with long QT syndrome. Heart Rhythm 2005:2(11); 1238-49

27. Yamaguchi M, et al: Compound heterozygosity for mutations Asp611→Thy in KCNQ1 and Asp609→Gly in KCNH2 associated with severe long QT syndrome. Clinical Sciense 2005: 108;143-150

28. Itoh H, et al: Long QT syndrome with compound mutations is associated with a more severe phenotype: a Japanese multicenter study. Heart Rhythm. 2010: 7(10); 1411-8

29. Shimizu W, et al: Mutation site-specific differences in arrhythmic risk and sensitivity to sympathetic stimulation in the LQT1 form of congenital long QT syndrome. J Am Coll Cardiol. 2004: 44; 117-125

30. Arthur J. Moss, et al: Clinical aspects of type-1 long QT syndrome by location, coding type, and biophysical function of mutations involving the KCNQ1 gene. Circulation. 2007:115; 2481-2489

31. Moss AJ: Long QT syndrome. JAMA. 2003; 289:2041–2044.

32. Wilde AA, Bezzina CR: Genetics of cardiac arrhythmias. Heart. 2005; 91:1352–1358

33. Sanguinetti MC: Long QT syndrome: ionic basis and arrhythmia mechanism in long QT syndrome type 1. J Cardiovasc Electrophysiol 2000; 11:710 –712.

34. Tester DJ, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ: Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. Heart Rhythm. 2005; 2: 507–517.

35. Bianchi L, et al: Mechanisms of I (Ks) suppression in LQT1 mutants. Am J Physiol. 2000; 279: H3003–H3011.

36. Shalaby FY, et al: Dominant-negative KvLQT1 mutations underlie the LQT1 form of long QT syndrome. Circulation. 1997; 96: 1733–1736.

37. Zareba W, et al: Location of mutation in the KCNQ1 and phenotypic presentation of long QT syndrome. J Cardiovasc Electrophysiol. 2003; 14: 1149 –1153.

38. Cox DR: Regression models and life-tables. J Stat Soc [B]. 1972;34: 187–220.

39. Therneau TM, Grambsch PM: Modeling Survival Data: Extending the Cox Model. New York, NY: Springer-Verlag; 2000.

40. Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. Cell. 1995; 81: 299–307.

41. Wang Q, et al: Cardiac sodium channel mutations in patients with long QT syndrome, an inherited cardiac arrhythmia. Hum Mol Genet. 1995; 4: 1603–1607.

42. Vatta M, etal: Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. Circulation. 2006; 114: 2104–2112.

43. Splawski I, et al: Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes: KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. Circulation. 2000; 102: 1178 –1185.

44. Shimizu W, et al: Diagnostic value of epinephrine test for genotyping LQT1, LQT2, and LQT3 forms of congenital long QT syndrome. Heart Rhythm.2004; 1: 276–283.

45. Sanguinetti MC, et al: Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. Nature. 1996; 384: 80–83.

46. Aizawa Y, et al: Truncated KCNQ1 mutant, A178fs/105, forms hetero-multimer channel with wild-type causing a dominant-negative

suppression due to trafficking defect. FEBS Lett. 2004; 574:145-150.

47. Hobbs JB, et al: Risk of aborted cardiac arrest or sudden cardiac death during adolescence in the long-QT syndrome. JAMA. 2006; 296: 1249-1254.

48. Moss AJ, et al: The long QT syndrome: prospective longitudinal study of 328 families. Circulation. 1991;84:1136-1144.

49. Locati EH, et al: Age- and sex-related differences in clinical manifestations in patients with congenital long-QT syndrome: findings from the International LQTS Registry. Circulation. 1998; 97: 2237-2244.

50. Zareba W,et al: Mod- ulating effects of age and gender on the clinical course of long QT syndrome by genotype. J Am Coll Cardiol. 2003; 42: 103–109

51. Tsuji K, et al: Mechanistic basis for the pathogenesis of long QT syndrome associated with a common splicing mutation in KCNQ1 gene. J Mol Cell Cardiol. 2007; 42: 662-669.