

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08083

研究課題名(和文) 大動脈解離・瘤および動脈管開存症の病態解明と原因遺伝子の探索

研究課題名(英文) The pathophysiological mechanisms and causative genetic mutations of familial aortic aneurysm/dissection and patent ductus arteriosus

研究代表者

今井 靖 (Imai, Yasushi)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：20359631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：診療現場で我々が経験した大動脈解離家系に見出されたMYH11遺伝子変異を導入した遺伝子改変マウスをCrisper-Cas9システムを用いて作成した。変異マウスにおいてヘテロ型でアンギオテンシン負荷モデルで大動脈解離を来しやすく、ホモ型では大動脈壁が脆弱で男性線維の断裂が観察され、またアンギオテンシン負荷にて大動脈解離が必発するとともに、全例で動脈管開存を合併しており、ヒト家系の表現型を再現し得た。加えて当院における大動脈解離症例についてパネル遺伝子解析を実施、大半の症例に原因となる遺伝子変異等を検出し得たが、このことは大動脈疾患の臨床遺伝子診断の意義を支持する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

家族性大動脈解離・瘤について予防・治療における管理・薬物療法は未確立である。そのため、ヒト家系に見出された遺伝子変異を組み入れ、表現型を再現する動物モデルを構築し得たことの意義は大きく、難病の治療解明へ大きく寄与することが期待される。さらに大動脈解離・瘤症例における臨床的遺伝子診断も我々の小規模の検討においては有用であった。大動脈疾患への基礎・臨床両面からのアプローチが今後も求められる。

研究成果の概要(英文)：We generated gene-engineered mice carrying a MYH11 causative mutation, which was detected in a Japanese pedigree with familial aortic dissection. We demonstrated that the heterozygous mice tended to suffer from aortic dissection in the Angiotensin II infusion model and the homozygous mice were complicated with aortic dissection and patent ductus arteriosus. Therefore, this mutant mouse is a promising animal model for hereditary aortic dissection in the field of cardiovascular medicine and pharmacology. In addition, we also performed genetic analyses for the patients with aortic aneurysm/dissection. We could detect causative genetic mutations in most of the cases, suggesting feasibility and importance of clinical genome sequencing for the aforementioned diseases.

研究分野：遺伝性・先天性心疾患

キーワード：大動脈解離 大動脈瘤 動脈管開存症 遺伝子改変マウス 臨床遺伝子診断 Myh11

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦において心臓血管病は主たる死因の一つであるが、心不全、心筋梗塞などに次いで臨床的に問題となるのは大動脈解離および大動脈瘤破裂(急性大動脈疾患)である。この急性大動脈疾患については、大動脈の拡大を早期に発見し、遮断薬などの薬物療法および待機的人工血管置換術を主とする外科手術で対応されるが、大動脈解離や瘤破裂を来した状況での緊急対応については予後は必ずしも良好とはいえない。このような状況にあり、大動脈疾患に対する病態生理の理解とその有効な管理手法の確立が喫緊の課題と考える。我々はマルファン症候群などの遺伝性大動脈疾患についての専門外来診療およびその遺伝子解・診断を従来から手掛けてきたが、その中で申請者自身が臨床現場で遭遇した家族性大動脈解離家系においてミオシンの新規変異(MYH11 c3766_3768 del AAG, pK1256del)を同定することが出来た。このような背景から、この遺伝子変異による病態発症の機序の解明および、他の家族性大動脈解離・瘤と考えられる患者・家系における新たな遺伝子変異を探索することを企画した。

2. 研究の目的

(1)我々が臨床現場で遭遇した家族性大動脈解離家系(一部の症例に動脈管開存を伴う)(MYH11 c3766_3768 del AAG, pK1256del)に見出した遺伝子変異を Crisper-Cas9 システムを用いて導入したマウスを樹立した。本研究においてはそのマウスの心臓血管系に関する特性と分析し、大動脈解離易発症性の機序を明らかにする。加えてこのマウスでは動脈管開存を伴う可能性があり、その場合には先天性心疾患のモデルとしての結構動態評価を併せて実施する。

(2)加えて本学附属病院に通院される大動脈解離・瘤(あわせて動脈管開存の方が家族におられればそれを含める)について遺伝子解析を行い、MYH11 の変異様式あるいは他の原因遺伝子による変異の頻度を把握する。

3. 研究の方法

(1)先述のマウスを用いて野生型、ヘテロ接合体、ホモ接合体における血管硬度、収縮特性を評価し一定の負荷が血管にかかったときに解離を来す血管脆弱性について評価を行う。あわせてホモ体において動脈管開存が生じるという点で動脈管を含めた動脈血管平滑筋の収縮性低下について検索を行う。この差異を生む点について、血管構成細胞、特に培養平滑筋細胞を用いて分子発現および細胞間結合・接着の相違などを解剖学的・生化学的に検証を行う。

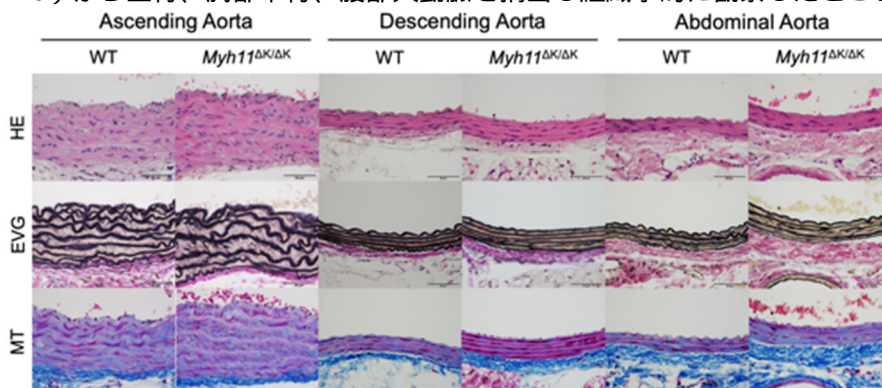
(2)大動脈瘤・解離を伴う症例で家族歴が濃厚に疑われる患者について次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析を行い、MYH11 変異を含む遺伝子群についてパネル解析を行い、新規遺伝子変異検索を行う。なお遺伝子解析については本学で実施する予定としていたが、かずさ DNA 研究所(千葉)がマルファン症候群を含めた家族性大動脈解離・瘤のパネル解析の受託(研究・診療を含め)を開始された時期と重なり、我々は本学での解析のコスト高を懸念しかずさ DNA 研究所への委託を行い、解析結果と臨床像との対比的分析を行うこととした。

4. 研究成果

(1)Myh11 遺伝子改変マウスの解析による大動脈疾患発生分子機序の解明

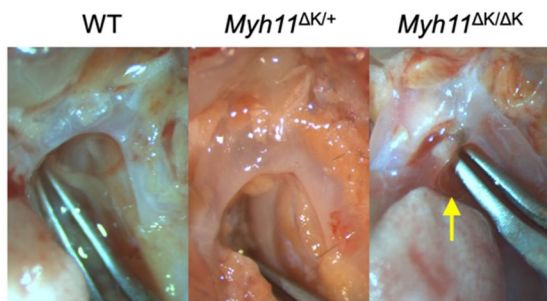
信州大学新藤隆行教授のご指導ご支援の元、Myh11 K1256del を CRISPR-Cas9 系を用いて B6 マウスに導入に成功した。自然交配で得られた仔マウスの遺伝子型はメンデル則に従っていた。雌マウスが変異体であった場合、死産や仔の喰殺、育児放棄が見られ、特に雌がホモ体の場合、子宮収縮不全/分娩遅延による死亡が多発した(以下、変異を ΔK 、野生型を+または WT で表現)。

マウスの血管の解剖学的特性を評価するため 12 週齢の WT, Myh11 ΔK /+, Myh11 ΔK / ΔK 雄マウス(n=5) から上行、胸部下行、腹部大動脈を摘出し組織学的に観察したところ



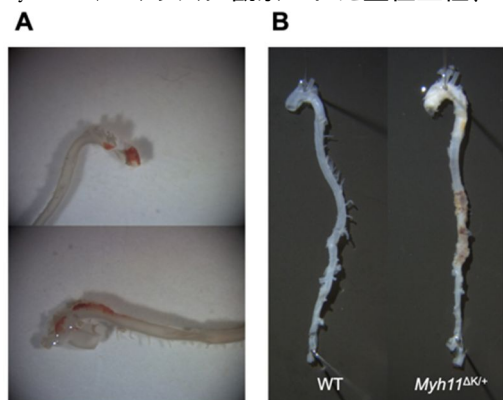
Myh11 ΔK / ΔK 大動脈では弾性板の断裂や中膜と外膜の肥厚が認められた。また解剖を行った全て

の Myh11 Δ K/ Δ K マウスに、大動脈の遠位弓部と肺動脈を繋ぐシャント血管を認め、PDA が全例に合併することが明らかとなった。比較的 PDA は細く、これに伴う心不全を来したと思われる個体は検出されなかった。



Myh11 Δ K/ Δ K 大動脈の形態学的な異常から、Myh11 K1256del が SMC の生理学的機能に影響を与えると考へた。SMC の生理機能を調べるため、収縮アゴニストや血管拡張薬に対する大動脈の張力反応を測定した。フェニレフリンによって発生した張力は Myh11 Δ K/ Δ K 大動脈で有意に低下していたが、ヘテロ型すなわち Myh11 Δ K/+型 SMC のフェニレフリンに対する収縮反応は野生型と同等であった。大動脈の血管拡張反応については、アセチルコリンによる内皮依存性拡張反応とニトロプルシドによる内皮非依存性拡張反応は WT と Myh11 Δ K/+ で有意な差は認められなかった(なお Myh11 Δ K/ Δ K 大動脈の拡張反応はフェニレフリンによる前収縮が不十分であり実施せず)。

変異マウスで認められた大動脈の構造的な脆弱性と機械的ストレスに対する適応性の低下は大動脈解離の発症に繋がると思われた。Myh11 K1256del による大動脈解離の病態を検討するために 8 週齢の WT (n=16) と Myh11 Δ K/+ マウス (n=15) に対して AngII (1000 ng/kg/min) を浸透圧ポンプで 2 週間負荷する大動脈解離モデルを作成。AngII 負荷前後での血圧には有意差は無かったが、Myh11 Δ K/+ マウスの AngII 負荷後の大動脈には小さな壁在血栓が高率に認められるとともに、大動脈解離は 6 匹 (40.0%) の Myh11 Δ K/+ マウスに発生し、そのうち 2 匹 (13.3%) が瘤破裂で死亡した。一方 WT マウスにおいては AngII 負荷後に壁在血栓や大動脈解離は認められなかった。なお Myh11 Δ K/ Δ K マウスにおいては AngII 負荷にて全例、大動脈瘤破裂で死亡した。下の図では A: Myh11 Δ K/+ マウスに観察された壁在血栓、B: Myh11 Δ K/+ マウスに観察された大動脈解離を示す。



変異大動脈で認められた病理特性を確認するため、Myh11 Δ K/ Δ K 大動脈の遺伝子発現とタンパク発現を解析。それらの中でエラスチンの発現が Myh11 Δ K/ Δ K 大動脈で有意に低下しており、さらに細胞接着に関する分子 focal adhesion kinase (FAK) の発現が Myh11 Δ K/ Δ K 大動脈で有意に低下しており、これらが少なくとも部分的に表現型の相違をもたらす原因と考えられた。

このマウスは大動脈解離および動脈管開存を来すヒトでの表現型を再現しておりスタチン、および新規化合物で大動脈疾患への効果が期待される薬剤の治療効果を判定するためのスクリーニングを行う上で良いモデルマウスとなることが示された。これまでの成果について共同研究者の元で展開された実験データを統合し現在投稿中である。

(2) 家族性大動脈解離・瘤に対する遺伝子解析

先述の通り、家族性を有し大動脈解離・瘤を来した患者あるいは家系について遺伝子解析を実施した。臨床現場では身体表現型からマルファン症候群が疑われる患者が多く結果的に FBN1 変異が多数を占めたが、他にも FBN2 変異等を見出しており、今後身体表現型で典型的な Marfan 症候群、血管型 Ehlers-Danlos 症候群でなければ大血管疾患への関連性が示唆される遺伝子群を広くパネル解析を行うことが重要と考えられた。遺伝子解析結果と得られた変異は以下の通りである (* は stop codon (termination mutation) を示す)。

番号	年齢・性別	疾患・表現型	検出された遺伝子変異
1	40 歳台男性	マルファン症候群 大動脈解離	<i>FBN1</i> c.718C>T p.Arg240Cys
2	20 歳台女性	動脈解離（脳血管ほか）	<i>COL3A1</i> c.3613A>G 病源性不明
3	40 歳台男性	マルファン症候群 大動脈解離	<i>FBN1</i> c.5716-5717insATT p.Arg1966del insHisTrp
4	30 歳台男性	急性大動脈解離（身体表現型軽微）	<i>FBN1</i> c.643C>T p.Arg215*
5	60 歳台男性	上行・下行胸部大動脈解離	変異無し
6	20 歳台男性	水晶体亜脱臼・側弯	病的変異無し
7	10 歳台女性	大動脈拡大、大動脈閉鎖不全	病的変異無し
8	50 歳台女性	マルファン症候群、大動脈解離	<i>FBN1</i> c.1745G>A p.Cys582Thr
9	30 歳台男性	マルファン表現型・大動脈解離	<i>FBN2</i> c.3518C>G pThr1173Ser
10	30 歳台男性	急性大動脈解離	病的変異無し
11	未就学男児	大動脈拡大、脊椎・胸郭変形	<i>FBN1</i> c.3158G>A p.Cys1053Tyr
12	40 歳台男性	大動脈解離	病的変異無し
13	40 歳台女性	マルファン症候群、大動脈解離	<i>FBN1</i> c.2464A>T p.Lys822*
14	30 歳代女性	家族性大動脈解離	<i>ACTA2</i> c.116G>A p.Arg39His
15	40 歳台男性	大動脈解離	変異無し
16	40 歳台男性	大動脈解離	変異無し
17	20 歳台男性	大動脈基部拡大・水晶体亜脱臼	<i>FBN1</i> c.1122delT p.Glu375fs
18	10 歳台男性	胸郭変形・水晶体亜脱臼（家族歴有）	<i>FBN1</i> c.1709G>C p.Cys570Ser
19	40 歳台男性	大動脈解離	変異無し
20	10 歳台女性	高身長・胸郭変形・家族歴（解離）	<i>smad3</i> 変異

マルファン症候群の身体表現型が modified Ghent nosology (2010)に従って確定している症例においては 1 例を除いて *FBN1* 遺伝子変異が陽性（ナンセンス変異、Cys 残基を伴うミスセンス変異、挿入・欠失変異）であった。身体表現型から Marfan 症候群と確定診断していた 1 例は *FBN1* 遺伝子に変異がなく *FBN2* 遺伝子変異を認めた。家族性大動脈解離ではマルファン表現型に乏しいが *FBN1* 変異を伴うもの、*ACTA2* 変異（pathogenic の可能性が高い）を 1 例ずつ認めたが、その他の大動脈解離症例ではパネル解析の対象とした遺伝子群について変異は検出されなかった。大動脈瘤・解離について未発症であるが大動脈解離の家族歴のあった 2 例については 1 例は *FBN1* 遺伝子変異、もう 1 例は *smad3* 遺伝子変異であり、特に後者は報告が少ないため今後、本例および家系について慎重にフォローを継続する予定である。

最近ではマルファン症候群を主体とした家族性大動脈解離・瘤について遺伝子解析が保険収載され、当院でも研究から保険診療へと最近移行したが今後、これらの疾患についての遺伝子情報の集積から遺伝子変異をガイドとした予防・内科/外科治療の最適化が図られることが求められる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tomida S, Aizawa K, Nishida N, Aoki H, Imai Y, Nagai R, Suzuki T.	4. 巻 24
2. 論文標題 Indomethacin reduces rates of aortic dissection and rupture of the abdominal aorta by inhibiting monocyte/macrophage accumulation in a murine model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 10751
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-46673-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 今井靖	4. 巻 別冊循環器II
2. 論文標題 大動脈疾患 家族性胸部大動脈瘤・解離(FTAAD)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本臨床 別冊循環器症候群II	6. 最初と最後の頁 364-366
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yagi Yuichiro, Kuwahara Makoto, Suzuki Junpei, Imai Yasushi, Yamashita Masakatsu	4. 巻 530
2. 論文標題 Glycolysis and subsequent mevalonate biosynthesis play an important role in Th2 cell differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 355 ~ 361
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.08.009	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ushijima Kentaro, Suzuki Chisato, Kitamura Hiroko, Shimada Ken, Kawata Hirotooshi, Tanaka Akira, Horie Hisanaga, Hosoya Yoshinori, Imai Yasushi, Yamashita Chikamasa, Fujimura Akio	4. 巻 8
2. 論文標題 Expression of clock gene Dbp in omental and mesenteric adipose tissue in patients with type 2 diabetes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMJ Open Diabetes Research & Care	6. 最初と最後の頁 e001465 ~ e001465
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/bmjdr-2020-001465	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 根岸経太、相澤健一、今井靖、永井良三
2. 発表標題 A novel mouse model of familial thoracic aortic aneurysms and dissections with a deletion mutation in Myh11
3. 学会等名 第40回日本臨床薬理学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 根岸経太、相澤健一、今井靖 他
2. 発表標題 A Deletion Mutation in Myosin Heavy Chain MYH11 Reduces the Contraction Force of the Aorta Resulting in Aortic Dissection
3. 学会等名 第83回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井靖
2. 発表標題 診療・生体情報の統合的集積・データベース構築とそれを利用したゲノム・バイオマーカー研究
3. 学会等名 第67回日本心臓病学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芳野真子、今井靖、根岸経太、川人宏次、苅尾七臣
2. 発表標題 重症大動脈弁閉鎖不全・心不全から回復し良好に経過したマルファン症候群の一例
3. 学会等名 第255回日本循環器学会関東甲信越地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田俊哉、今井靖、根岸経太、苅尾七臣
2. 発表標題 典型的なマルファン表現型を呈したFBN2遺伝子変異を伴う大動脈解離の一例
3. 学会等名 第252回日本循環器学会関東甲信越地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井靖
2. 発表標題 成人先天性心疾患治療介入に必要な知識
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	永井 良三 (Nagai Ryoza) (60207975)	自治医科大学・医学部・学長 (32202)	
研究分担者	相澤 健一 (Aizawa Kenichi) (70436484)	自治医科大学・医学部・准教授 (32202)	
研究分担者	高橋 政夫 (Takahashi Masao) (00447418)	自治医科大学・医学部・講師 (32202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------