

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17357

研究課題名（和文）家族性先天性心疾患家系における全エクソーム解析による原因遺伝子の探索

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of causative gene in familial congenital heart disease by whole exome analysis

研究代表者

山本 英範（YAMAMOTO, Hidenori）

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80801662

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：遺伝性に先天性心疾患を発症する3家系で原因遺伝子探索を行った。全家系で原因遺伝子が判明した。

1つの家系においてABL1の新規変異が原因であった。ABL1の異常による先天性心疾患の発症メカニズムは全く解明されておらず、培養細胞を用いた実験でUFD1（22q11.2欠失症候群における心疾患発生に關与する蛋白）のリン酸化亢進が判明した。ABL1異常に伴う先天性心疾患の発症メカニズムについて世界で初めて検討した研究として論文報告した。

他の2家系についても、それぞれTBX20（論文投稿中）、遺伝子Y（機能解析実験の準備中）の新規遺伝子異常が判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性心疾患の約10%が単一遺伝子異常に由来すると考えられているが、本研究で対象としたような多数の発症者を含む大家系では、網羅的遺伝子解析を行うことで、非常に高率に原因遺伝子が判明することが示された。単一遺伝子異常に由来する先天性心疾患は、原因遺伝子によって発症しうる心疾患がある程度予測可能であるため、原因遺伝子を判明させることは、次子・次世代の発症リスクの予測や、将来的には出生前診断、着床前診断に有用となる可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：The causative genes were searched for in 3 families with hereditary congenital heart disease, which were revealed in all families.

One of them was a novel mutation in ABL1. The onset mechanism of congenital heart disease due to abnormal ABL1 has not been elucidated at all, and experiments using cultured cells revealed increased phosphorylation of UFD1. We reported this as the first study to examine the onset mechanism of congenital heart disease associated with ABL1 abnormalities.

In the other two families, new gene abnormalities of TBX20 (submitting) and gene Y (preparing for functional analysis experiment) were found, respectively.

研究分野：遺伝性心疾患

キーワード：先天性心疾患 全エクソーム解析 プロテオーム解析 チロシンキナーゼ 22q11.2欠失症候群

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 先天性心疾患 (CHD) は 100 人に一人が発症する最も高頻度な先天性疾患であり、生命予後にも大きな影響を及ぼす。診断・治療技術の向上により、予後は大きく改善している一方で、その発症メカニズムは依然として未解明な点も多い。

(2) CHD の原因としては遺伝的素因に環境素因が加わった多因子遺伝と考えられているが、一部に単一遺伝子異常に由来する常染色体優性遺伝形式を呈する家系も存在する。近年では、次世代シーケンサーによる全エクソーム解析で、原因遺伝子の同定を試みるのが可能となった。

### 2. 研究の目的

(1) 複数のメンバーが CHD を呈する家系において、全エクソーム解析を行い、原因遺伝子探索を行うことを目的とした。

(2) 原因遺伝子を特定した家系において、変異の病的意義が不明である場合や発症機序が未解明な場合には、積極的に機能解析実験を試みることも目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 家族性 CHD を呈する家系の各メンバー (未成年の場合は代諾者) から書面同意を得て、血液または唾液サンプルを採取し、DNA を抽出する。

(2) 抽出された DNA を用いて全エクソーム解析を行い、各種データベースを用いて minor allele frequency や in silico データから候補遺伝子の絞り込みを行う。

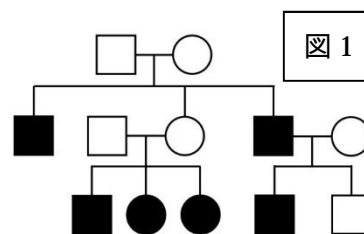
(3) 候補遺伝子の機能解析実験を行う。

### 4. 研究成果

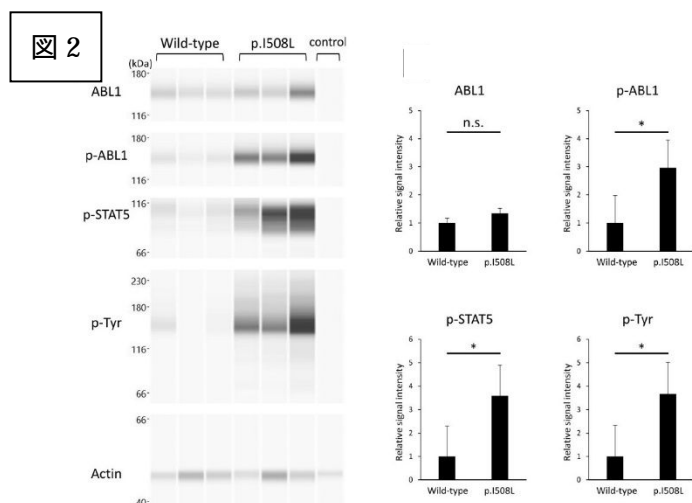
常染色体優性遺伝形式に 4~7 人に CHD が認められた 3 家系を研究対象とした。全家系において原因遺伝子を特定することができた。多数のメンバーに CHD が認められる家系においては、全エクソーム解析は大変有用である可能性が示された。

#### (1) 1 家系目

6 人に心室中隔欠損が認められた (図 1)。全エクソーム解析により *ABL1* (NM\_007312) の新規ミスセンス変異 (c.1522A>C, p.I508L) が確認され、サンガー法で検証された。*ABL1* は 2017 年にはじめて CHD の原因遺伝子と報告された遺伝子であった。(Wang X, et al. *Nat Genet* 2017)



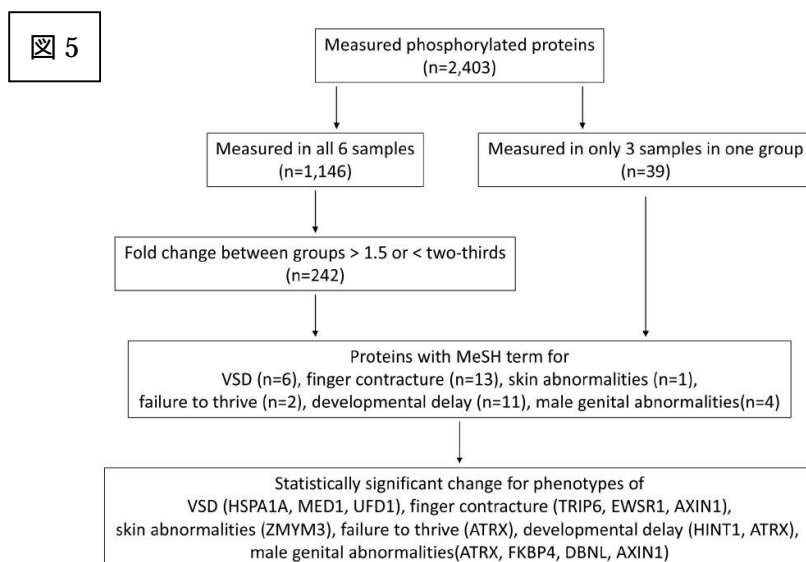
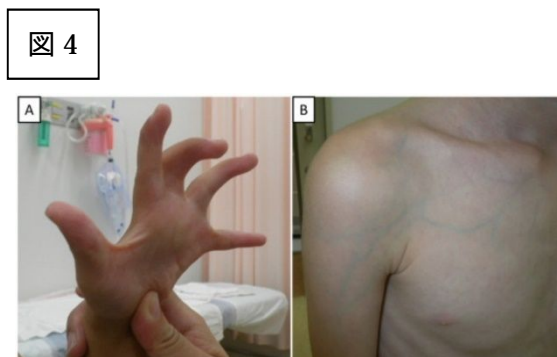
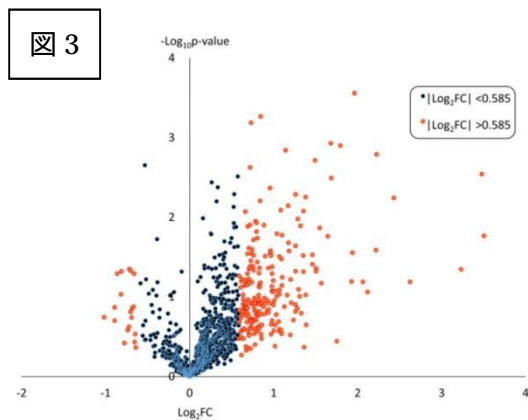
HEK293 細胞を用いて野生型・変異型 *ABL1* の強制発現実験を行った。抽出蛋白を用いてウエスタンブロット法を行った結果、下図のように *ABL1* および下流分子である *STAT5* のチロシンリン酸化亢進が確認され、機能獲得型変異と断定した。



本遺伝子異常による CHD 発症メカニズムは全く知られていなかったため、心臓発生に参与する分子のリン酸化を評価する目的で、同抽出蛋白を用いてリン酸化プロテオーム解析を行った。測定されたリン酸化蛋白のうち、野生型・変異型で大きく変動した蛋白 (図 3 の赤プロット) から特に CHD への関与が強いものを選出した。また *ABL1* の機能獲得型変異では CHD の他にも骨格異常 (図 4A: 指関節の拘縮) や皮膚異常 (図 4B: 薄い皮膚) などの表現型を呈することも知られており、各表現型に関連する蛋白も選出した (図 5)。CHD (図 5 では VSD と表記) の関連のあるものの中でも、

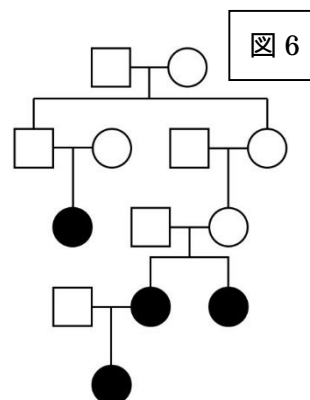
UFD1 は 22q11.2 欠失症候群の CHD 発症に関与する分子であり、両疾患の発症に際して共通する分子メカニズムが存在する可能性を世界で初めて報告した。また、*AXIN1* および *ATRX* も各

表現型の発症に関与している可能性がある旨も併せて報告した。



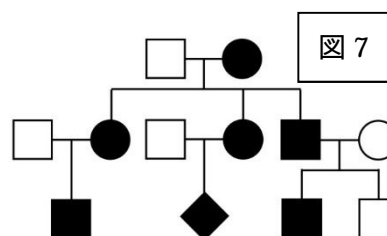
(2)2 家系目

4 人に CHD (心室中隔欠損、心房中隔欠損など) が認められた (図 6)。全エクソーム解析により、*TBX20* (NM\_001077653) の新規 9 塩基欠失が確認され、サンガー法で検証された。*TBX20* は CHD の原因遺伝子として知られており、また本欠失は米国臨床遺伝・ゲノム学会のガイドラインで“Likely pathogenic”に分類されるため、本家系における CHD の原因遺伝子と判断し、研究を終了した。現在論文投稿中である。



(3)3 家系目

7 人に CHD (房室中隔欠損など) が確認された (図 7)。全エクソーム解析により、遺伝子 Y の新規ミスセンス変異が確認され、サンガー法で検証された。遺伝子 Y は CHD の中でも単心室症の原因遺伝子として知られているが、本家系ではほとんどのメンバーにおける CHD は心中隔欠損症であった。本変異は米国臨床遺伝・ゲノム学会のガイドラインでは“Variant of unknown significance”に分類され、機能解析実験を計画している。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamamoto Hidenori, Fukasawa Yoshie, Ohashi Naoki, Yokoyama Takehiko, Suzuki Kazutaka, Ota Takaya, Yasuda Kazushi, Omoya Kentaro, Takahashi Yoshiyuki, Kato Taichi	4. 巻 61
2. 論文標題 Prediction of postnatal clinical course in primary congenital dilated cardiomyopathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 1196 ~ 1201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.14029	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 -
1. 著者名 Yamamoto Hidenori, Fukasawa Yoshie, Kato Taichi	4. 巻 29
2. 論文標題 Ventricular tachycardia and chest pain due to foreign body in the pericardium caused by self-injurious behaviour	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cardiology in the Young	6. 最初と最後の頁 1217 ~ 1218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/S1047951119001744	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 -
1. 著者名 Yamamoto Hidenori, Fukasawa Yoshie, Kato Taichi	4. 巻 29
2. 論文標題 Severe fetal cardiomegaly caused by multiple non-giant placental chorioangiomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cardiology in the Young	6. 最初と最後の頁 1559 ~ 1560
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/S1047951119002567	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 -
1. 著者名 Suzuki Kazutaka, Kato Taichi, Koyama Satoshi, Shinohara Tsutomu, Inukai Sachiko, Sato Jun, Yamamoto Hidenori, Omori Daisuke, Yoshida Shuichiro, Takeda Sho, Nishikawa Hiroshi, Ohashi Naoki, Sakurai Hajime, Saitoh Shinji	4. 巻 61
2. 論文標題 Influence of Percutaneous Occlusion of Atrial Septal Defect on Left Atrial Function Evaluated Using 2D Speckle Tracking Echocardiography	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 83 ~ 88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.19-173	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 -

1. 著者名 Suzuki Toshihiko, Sato Yoshiaki, Yamamoto Hidenori, Kato Taichi, Kitase Yuma, Ueda Kazuto, Mimatsu Haruka, Sugiyama Yuichiro, Onoda Atsuto, Saito Shigeki, Takahashi Yoshiyuki, Nakayama Takayuki, Hayakawa Masahiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Mesenchymal stem/stromal cells stably transduced with an inhibitor of CC chemokine ligand 2 ameliorate bronchopulmonary dysplasia and pulmonary hypertension	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cytotherapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcyt.2020.01.009	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 -

1. 著者名 Yamamoto Hidenori, Hayano Satoshi, Okuno Yusuke, Onoda Atsuto, Kato Kohji, Nagai Noriko, Fukasawa Yoshie, Saitoh Shinji, Takahashi Yoshiyuki, Kato Taichi	4. 巻 326
2. 論文標題 Phosphorylated proteome analysis of a novel germline ABL1 mutation causing an autosomal dominant syndrome with ventricular septal defect	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 81~87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijcard.2020.10.032	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 -

1. 著者名 Kataoka Shinsuke, Kawashima Nozomu, Okuno Yusuke, Muramatsu Hideki, Miwata Shunsuke, Narita Kotaro, Hamada Motoharu, Murakami Norihiro, Taniguchi Rieko, Ichikawa Daisuke, Kitazawa Hironobu, Suzuki Kyogo, Nishikawa Eri, Narita Atsushi, Nishio Nobuhiro, Yamamoto Hidenori, Fukasawa Yoshie, Kato Taichi, Takahashi Yoshiyuki	4. 巻 in press
2. 論文標題 Successful treatment of a novel type I interferonopathy due to a de novo PSMB9 gene mutation with a Janus kinase inhibitor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2021.03.010	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 -

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山本英範、深澤佳絵、小野田淳人、三浦良介、呉尚治、沼口敦、佐藤義朗、加藤太一
2. 発表標題 早産児慢性肺疾患に合併する肺高血圧症のモデルラット作成および網羅的病態解明
3. 学会等名 第55回日本小児循環器学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本英範、早野聡、奥野友介、小野田淳人、加藤耕治、長井典子、深澤佳絵、齋藤伸治、高橋義行、加藤太一
2. 発表標題 ABL1変異は先天性心疾患を伴う症候群の原因となる～エクソーム解析と質量分析法を応用した遺伝性心室中隔欠損症の網羅的病態解明～
3. 学会等名 第56回日本小児循環器学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本英範、早野聡、森本美仁、郷清貴、深澤佳絵、加藤太一
2. 発表標題 TBX20新規9塩基欠失が確認された遺伝性心中隔欠損の1家系
3. 学会等名 第130回東海小児循環器談話会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------