

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08460

研究課題名（和文）拡張型心筋症におけるオートファジー関連遺伝子変異の臨床的意義の解明

研究課題名（英文）Clarification for clinical significance of autophagy-related gene variants in dilated cardiomyopathy

研究代表者

齋藤 恒徳 (Saito, Tsunenori)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：00716631

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）：オートファジー関連遺伝子変異が心筋細胞障害の原因となるか調べることを目的とした。32例のDCM患者にDNAの全エクソーム解析を行い心筋症関連116遺伝子およびオートファジー関連44遺伝子に着目したところ、ATG2B (c.1939C>T) およびPSEN2 (c.1262C>T) の変異がDCMの原因である可能性が示された。PSEN2の機能解析を行ったところ、2021年5月にPSEN2はミトファジーを司る蛋白質パーキンの細胞質からミトコンドリアへの細胞内移送を担っていることを明らかにした。オートファジー関連遺伝子変異が心筋細胞障害の原因となりうることを証明でき、研究目的を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

拡張型心筋症（DCM）の心筋症関連遺伝子変異の電子顕微鏡所見との比較により、超微形態はそれぞれの遺伝子変異を示唆していた。本邦では初発心不全全例への遺伝子検査は保険診療上不可能である。電顕所見は遺伝子検査の要否を判断する一助となりうる。オートファジー関連遺伝子変異の網羅的探索ではPSEN2遺伝子がDCMの原因の一つとなることが示唆され、PSEN2遺伝子の機能解析では、同遺伝子変異がミトファジー不全を惹起し、ミトコンドリアの恒常性を維持できなくなるため心筋細胞障害の原因となると結論付けられた。

研究成果の概要（英文）： The purpose of this research project was to investigate whether autophagy-related gene mutations cause cardiomyocyte damage. Whole exome DNA analysis of 32 DCM patients focused on 116 genes related to cardiomyopathy and 44 genes related to autophagy, and mutations in ATG2B (c.1939C>T) and PSEN2 (c.1262C>T) were associated with DCM. It was shown that this may be the cause.

A functional analysis of PSEN2 revealed in May 2021 that PSEN2 is responsible for the intracellular transport of Parkin, a protein that controls mitophagy, from the cytoplasm to the mitochondria. We were able to prove that autophagy-related gene mutations can cause cardiomyocyte damage, achieving our research objective.

研究分野：循環器内科

キーワード：オートファジー 拡張型心筋症 全エクソーム解析 ミトファジー 電子顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

日本における心移植の基礎疾患として最も多い疾病は拡張型心筋症 (DCM) であるが、DCM で生じる心筋細胞障害の機序は解明されていない。現在の心不全治療として、DCM の心筋細胞障害自体を改善する治療法は確立されていない。近年、DCM の原因となる様々な遺伝子変異が解明され、また遺伝子変異の差異により DCM の臨床病型が異なることも明らかになりつつある。しかし DCM において原因遺伝子変異は 30%程度しか同定されず、現在明らかになっている筋原線維や核などに関連する遺伝子以外の遺伝子変異も DCM の発症に関与している可能性も考えられる。

オートファジーは細胞の自己成分を細胞内消化器官であるリソソームに運び込み分解する作用である。申請者らは、初発の心不全を発症し新規に DCM と診断された患者の心筋細胞を電子顕微鏡 (電顕) で観察したところ、オートファジーが認められない症例は有意に予後が不良であった。オートファジーは全ての真核細胞が有する作用であり、栄養状態の悪化や低酸素で誘導される。心不全は心筋組織の低栄養や低酸素をもたらすが、オートファジーの誘引となる状況が心不全により作られたときにオートファジーが出現しないのは正常な状態ではない。オートファジーの欠如や出現の遅延には、何らかの遺伝学的要因の関与が強く疑われる。

## 2. 研究の目的

オートファジー不全が DCM の原因になりうるかどうかを解明するために、オートファジーに関連する遺伝子変異が心筋細胞障害をもたらすかどうかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 心筋症関連遺伝子変異の解析

家族歴のない DCM 32 例の末梢白血球分画から抽出した DNA の全エクソーム解析を行い網羅的に検出された遺伝子変異について、116 遺伝子 (心筋症関連 75 遺伝子と不整脈関連 41 遺伝子) に着目した。得られた遺伝子変異を心筋生検標本の超微形態と比較検討した。

### (2) オートファジー関連遺伝子変異の網羅的探索

同じコホートにおいて、オートファジー関連 29 遺伝子およびオートファジー関連蛋白をコードする 15 遺伝子に着目し解析した。

### (3) PSEN2 遺伝子の機能解析

遺伝子変異の得られたもののうち、後期エンドゾーム・リソソームにおけるプロテアーゼである  $\gamma$ -セクレターゼを構成するプレセニン 2 をコードする遺伝子 *PSEN2* に着目し機能解析を行った。ラット培養心筋細胞を *Psne2* の siRNA を用いて遺伝子抑制を行い、ミトコンドリア選択的オートファジー (マイトファジー) 誘導剤 carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) 処理により各種蛋白質および mRNA の発現動態、ミトコンドリア機能について調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 心筋症関連遺伝子変異の解析

全エクソーム解析の結果を心筋症関連 116 遺伝子変異に焦点を当てた結果、404 遺伝子変異を認めた。マイナーアレル頻度  $\leq 0.0005$  をカットオフ値とし、各遺伝子変異の病原性・非病原性の診断は拡張型心筋症に特化した American College of Medical Genetics (ACMG) および Clingen によるガイドラインに準拠したところ、15 の病原性・準病原性遺伝子変異と 35 の臨床意義不明のバリエント (VUS) を認めた。病原性・準病原性遺伝子変異の内訳は 5 例の筋原線維関連遺伝子 (1 例の *MYBPC3* 変異と 4 例の *TTN* 変異)、3 例の核膜関連遺伝子 (同一の *TMEM43* 変異 c.271A>G)、2 例のギャップ結合関連遺伝子 (*DSP* 変異、1 例は *TTN* 変異も合併)、3 例のイオンチャネル関連遺伝子 (同一の *TRPM4* 変異 c.1532T>A)、2 例の T-Box 転写因子 5 遺伝子 (同一の *TBX5* 変異 c.52G>C) であった。

これらの遺伝子変異は、電子顕微鏡所見との形態学的相関を示していた。*MYBPC3* の変異では筋原線維の Z 板が凝集し筋フィラメントがほつれ、束ねてあった筋束がばらけているような像を呈していた。*TTN* 変異では、特に A 帯相当ドメインに変異を有する 3 例では Z 板は保持されているものの M 帯は消失しており、Z 線-Z 線間の筋原線維は粗となりスダレやびんざさのような形態を呈していた。文献的に報告されている *MYBPC3* 関連筋炎および *TTN* 関連筋炎の骨格筋の電顕所見と類似した形態であった。既報では筋原線維関連遺伝子変異を有する拡張型心筋症は比較的予後が良好であると示唆されているが、一概にそうとは言えず、このような症例にも注意深い経過観察が必要であると考えられた。

核膜蛋白 Luma をコードする *TMEM43* 遺伝子変異の症例は、初発心不全の際はアセチルコリン負荷試験で冠攣縮が誘発されたため  $\beta$  遮断薬の導入が遅れ、5 年後に他院で心移植を受けた。電顕所見では著しい核の形態異常（核内空胞を伴う分葉核）が認められた。

*TMEM43* 遺伝子変異では核の近傍に広範な筋原線維の変性・消失を認めた一方、ギャップ結合関連遺伝子である *DSP* 変異を伴う症例では細胞の辺縁に著しい筋原線維の変性・消失を認めた。このことから筋原線維の変性・消失という所見が二次的・非特異的なものであることに加え、この所見の出現部位が変異遺伝子を示唆する結果となった。

本邦では初発心不全症例の全例に遺伝子検査を行うことは保険診療上不可能である。電顕による超微形態は遺伝子検査の要否を判断する一助となりうるものが、本検討結果から強く結論付けられた。

## (2) オートファジー関連遺伝子変異の網羅的探索

*PSEN2* (c.1262C>T) の変異が DCM の原因となりうる可能性が示唆された。*PSEN2* は後期エンドゾーム・リソソームにおけるプロテアーゼである  $\gamma$ -セクレターゼを構成するプレセニリン 2 をコードする遺伝子である。この異常により細胞内老廃物の分解が行えず、アルツハイマー病だけでなく心機能障害の原因にもなりうることが報告されている。

## (3) *PSEN2* 遺伝子の機能解析

*Psen2* をノックアウトしたマウス線維芽細胞ではミトコンドリア代謝が著しく障害されていた (Contino S, et al. *Front Physiol.* 2017;8:796) ことから、ミトコンドリアの恒常性維持に対しプレセニリン 2 が何らかの役割を担っていることが示唆された。ミトコンドリアは細胞内呼吸を司る細胞内小器官であり、また心筋細胞はミトコンドリアが非常に多く分布するため、ミトコンドリア代謝障害が心筋細胞障害を来すことが容易に予測できた。

si*Psen2* で遺伝子抑制した H9c2 細胞に FCCP を作用させたところ、通常の H9c2 細胞に比べ ATP 産生能が著しく低下し、マイトファジー検出率が有意に低下した。このことからプレセニリン 2 はマイトファジーに強く関与していると考えられた。

FCCP 投与下の si*Psen2*-H9c2 細胞におけるオートファジー・マイトファジー関連蛋白を網羅的に解析した結果、同細胞では mRNA レベルでマイトファジーを司る蛋白であるパーキンが増加していたのに対し、単離ミトコンドリア分画ではパーキンは有意に減少していた。si*Psen2*-H9c2 細胞ではパーキンのミトコンドリアとの共局在が認められず、プレセニリン 2 はパーキンの細胞内移送を担いマイトファジーを支配していると分かった。また si*Psen2*-H9c2 細胞ではミトコンドリアにおける PINK1 (parkin をリン酸化し協働してマイトファジーを支配する蛋白質) およびリン酸化ユビキチンも減少していた。

これら一連の検討から、*PSEN2* 遺伝子変異はマイトファジー不全を惹起し、ミトコンドリアの恒常性を維持できなくなるため心筋細胞障害の原因となりうることを結論付けられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Saito Tsunenori, Sato Naoko Saito, Mozawa Kosuke, Adachi Akiko, Sasaki Yoshihiro, Nakamura Kotoka, Oka Eiichiro, Otsuka Toshiaki, Kodani Eitaro, Asai Kuniya, Mizuno Kyoichi, Shimizu Wataru, Gottlieb Roberta A.	4. 巻 8
2. 論文標題 Myocardial ultrastructure can augment genetic testing for sporadic dilated cardiomyopathy with initial heart failure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ESC Heart Failure	6. 最初と最後の頁 5178 ~ 5191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ehf2.13596	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Daniel J Klionsky, Tsunenori Saito, et al.	4. 巻 17
2. 論文標題 Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)<sup>1</sup>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1 ~ 382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2020.1797280	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Morooka M, Saito T, Kodani E.
2. 発表標題 Dilated cardiomyopathy but not mitochondrial cardiomyopathy with mitochondria- and mitophagy-related gene variants by whole-exome analysis.
3. 学会等名 第87回日本循環器学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Watanabe M, Saito T, Kodani E.
2. 発表標題 Electron microscopy shows a role of presenilin-2 in mitochondria-selective autophagy.
3. 学会等名 第87回日本循環器学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中島悠希、齋藤恒徳、上杉智香、諸岡雅城、大塚悠介、渡辺允、石原翔、鈴木啓士、中野博之、小谷英太郎、清水渉。
2. 発表標題 アベルマブによる心筋障害が疑われた一例。
3. 学会等名 第264回日本循環器学会関東甲信越地方会。
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡田泰司、齋藤恒徳、中野博之、小谷英太郎。
2. 発表標題 血球貪食症候群を契機に診断された急性心不全および急性腎障害の原因としてのHTLV-1感染。
3. 学会等名 第44回心筋生検研究会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Watanabe M, Saito T, Kodani E.
2. 発表標題 Comparison of ultrastructural features of cardiomyocytes with variants in known causal genes of dilated cardiomyopathy.
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤恒徳。
2. 発表標題 竹村元三先生追悼シンポジウム。拡張型心筋症における電子顕微鏡利用の今までとこれから。
3. 学会等名 第43回心筋生検研究会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Watanabe M, Saito T, Kodani E.
2. 発表標題 COVID-19 vaccine-related myocarditis diagnosed with cerebral infarction.
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡辺允, 齋藤恒徳, 小谷英太郎.
2. 発表標題 脳塞栓を契機に診断されたCOVID-19ワクチン関連心筋炎.
3. 学会等名 第43回心筋生検研究会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島悠希, 齋藤恒徳, 小谷英太郎.
2. 発表標題 アベルマブによる心筋障害が疑われた一例.
3. 学会等名 第8回日本心筋症研究会.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤恒徳
2. 発表標題 Presenilin 1 and Presenilin 2 contribute to mitophagy including alternative pathway.
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions（国際学会）
4. 発表年 2020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			
米国	Cedars-Sinai Medical Center			