

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590813

研究課題名(和文) 突然死と心不全予防のための発症前診断の総合戦略と、その実践

研究課題名(英文) Comprehensive strategy for presymptomatic diagnosis of sudden death and heart

研究代表者

豊岡 照彦 (TOYO-OKA, Teruhiko)

北里大学・医学(系)研究科(研究院)・客員教授

研究者番号：00146151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は我国固有の遺伝子に着目し、心筋内の核とミトコンドリアの両ゲノムを網羅的に解析する日本人用アレイの臨床展開を目指した。日本人家系は心不全と突然死を頻発したが、メタボ所見は全く見られなかった点から、mt遺伝子変異が核遺伝子に対して優位な階層構造を示している。即ち、両ゲノム変異は独立して心不全を呈するのではなく、両者の相互作用で複雑な病態を示すことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：This study paid its attention to our country's own gene and aimed at the clinical development of the array for Japanese who analyzed both genomes of intramyocardial nucleus and mitochondria a cyclopedically. The Japanese families were frequent for heart failure and sudden death, but, from the point where the metabolic views were not seen in at all, mt gene variation shows the hierarchical structure which is dominant for a nuclear gene. In other words, both genomes variation did not present heart failure independently, and it became clear to show the complicated condition of a patient by the interaction of both.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：循環器内科学

キーワード：心不全 突然死 遺伝子の網羅的解析

1. 研究開始当初の背景

近年、国内外で増加する心不全は、生活の質を損ない、筆頭死因群を構成する。その原因が多彩で、予防・予後予測が遅れており、集団差が著明で、外国データを使い難い点も治療を阻害していた。我々が国際誌に報告した心不全関連遺伝子も海外製は西欧人ベースで日本人の解析に不適切だった。本研究は我国固有の遺伝子に着目し、心筋内の核とミトコンドリアの両ゲノムを網羅的に解析する日本人用アレイの臨床展開を目指した。特に心房症候群との併発例は我国の厳しい医療経済を更に、圧迫している。この成果は我国に特化した心不全と心房の先制的個別予防・治療に貢献し、医療福祉に大きく寄与する。

2. 研究の目的

上記結果と、以前、我々が報告したミトコンドリアの酸化障害は心筋細胞のミトコンドリアを惹起して心不全に直結する事(Toyooka T, Arisaka H, Sanma H, Shin WS, Dan Y, Sugimoto T. Synergistic deleterious effect of micromolar Ca ions and free radicals on respiratory function of heart mitochondria at cytochrome C and its salvage trial. *BBRC*, 163:1397-403, 1989.)を踏まえ、核内遺伝子と mt ゲノムの全配列決定による網羅的な解析を目指した。

実際、mt 遺伝子変異により、心不全と突然死が多発する家系から、我々は mt ゲノムの一部が心不全の危険因子として重要な事を報告してきた(Shin WS, Tanaka M, Suzuki J, Hemmi C, Toyooka T. A novel homoplasmic mutation in mtDNA with a single evolutionary origin as a risk factor for cardiomyopathy. *Am J Hum Genet*. 67:1617-20, 2000).以上から、今回は心不全関連遺伝子として核と mt の両ゲノムに着目して網羅的な遺伝子解析を目指した。

3. 研究の方法

(ゲノム解析と発現解析)

(1) ヒゲノム解析に当たり、各研究者は所属施設

の倫理委員会に許可申請し、その許可を得て解析した。全ゲノム中の SNP と CNV は Affymetrix® Genome-Wide Human SNP Array 6.0 で遺伝子型タギングによる Quality control 後に比較した。さらに、次世代シーケンサーの Sangger 法によりゲノム配列を網羅した変異解析を実施した。

(2) 更に、mt ゲノムの全配列を Affymetrix® GeneChip® Human Mitochondrial Resequencing Array 2.0 で決定した。この解析には mt 遺伝子は細胞内呼吸で必然的に活性酸素を発生して、後天的にも変異を起こす可能性が高く、可能な限り心筋細胞から genomic DNA を得たが、健常者を含め、新鮮な心筋細胞を得にくい場合は末梢血より精製した DNA/RNA で代用せざるを得なかった。

(3) 白人症例との比較

申請者が既に医学部倫理委員会で承認を得て、約 100 症例の日本人心不全患者の左室補助循環装着(LVAD)手術時、または心移植手術の際に得られた 100mg の心筋組織を得た。DCM は民族差が大きく、欧米に比較的希な DCM 症例の遺伝的素因の相違を知る事は病態を知る上で極めて重要である。また、mt 遺伝子変異は疾病とは関わらない haplogroup を形成する為に、民族差を知る上で非常に有用である。その目的で、我々はドイツ Max-Planck 研究所の共同研究で分与された、約 30 名分の凍結心筋組織 (Toyooka *et al.*, *PNAS* 2004)、から genomic DNA、および RNA を分離した。

4. 研究成果

前記のように遺伝子変異は他の近隣部位、異なる染色体や mt など他のゲノムにも重複変異をきたし、連鎖する 경우가少なくなかった。再生医療の実用化に際して、遺伝子解析には連鎖不平衡(Linkage Disequilibrium; LD)解析等の高度な遺伝統計学のツールの開発

と、その使いこなしに高い computer science 技能が求められる。また、その解析結果の臨床医学的意味付けには広い医学知識が必須となる。

分担研究者らは核遺伝子と mt 遺伝子の重複変異を 75 家系の中で 6 人に同定した。その相互作用を検討した結果、核ゲノムについてはミトコンドリア重鎖(MYH7)、または亜鉛トランスポートとして報告された SLC39A8 遺伝子変異が多発した。一方、mt ゲノムは予想外の核ゲノムと相乗効果を示し、両ゲノム間に病原性(pathogenicity)や表現型(phenotype)に大差が示されて、重症心不全や突然死を多発した。これは、従来、東アジア人にのみ認められ、白人には発現していないと報告されていた B5b1a に限られていた点は従来の報告と一致した。しかし、同一患者の核ゲノムでは白人に特異的と考えられてきた SLC39A8(Wen *et al.*, Meta-analysis of genome-wide association studies in East Asians identifies novel genetic variants associated with body mass index. *Nature Genetics* 44; 307, 2012)が、全て B5b1a だった。

驚くべきことにSLC39A8は、既にメタボを構成する高血圧(Ehret *et al.*, Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk, *Nature*, 478;103, 2011)、高脂血症(Teslovich *et al.*, Biological, clinical, and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* 466: 707–713, 2010.)と体格(BMI; Speliotes *et al.*, Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat-Genet*, 42; 938, 2010)の3大疾患に共通して認められる関連遺伝子だった。

興味有る事に、従来、上記日本人家系は心不全と突然死を頻発したが、メタボ所見は全く見られなかったことから、mt 遺伝子変異が核遺伝子に対して優位な階層構造を示している。即ち、両ゲノム変異は独立して心不全を呈するのではなく、両者の相互作用で複雑な病態を

示すことが明らかになった。この変異は白人や他のアジア系民族には未報告で、我国固有の変異と考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 25 件)

1. Kurokawa S, Niwano S, ...Izumi T, *et al.*, Cardiomyocyte-Derived Mitochondrial Superoxide Causes Myocardial Electrical Remodeling by Downregulating Potassium Channels and Related Molecules. *Circ J*. 2014 In press.
2. Kishihara J, Niwano S, Izumi T, *et al.*, Effect of carvedilol on atrial remodeling in canine model of atrial fibrillation. *Cardiovasc Diagn Ther*. 4:28-35, 2014.
3. Imamura Y, Tsuruya Y, ...Izumi T, *et al.*, 6β-Hydroxycortisol is an endogenous probe for evaluation of drug-drug interactions involving a multispecific renal organic anion transporter, OAT3/SLC22A8, in healthy subjects. *Drug Metab Dispos*. 42:685-94, 2014.
4. Matsumoto M, Hori M, ...Izumi T, *et al.*, J-ROCKET AF Study Investigators Rivaroxaban versus warfarin in Japanese patients with non-valvular atrial fibrillation in relation to hypertension: a subgroup analysis of the J-ROCKET AF trial. *Hypertens Res*. 37:457-62, 2014.
5. Uchiyama S, Hori M, ...Izumi T, *et al.*, Net Clinical Benefit of Rivaroxaban versus Warfarin in Japanese Patients with Nonvalvular Atrial Fibrillation: A Subgroup Analysis of J-ROCKET AF. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 23:1142-7, 2014.

6. Ishikawa S, Niwano S, ...[Izumi T](#). Usefulness of a simple prognostication score in prediction of the prognoses of patients with out-of-hospital cardiac arrests. *Int Heart J*. 54:362-370, 2013.
7. Niwano S, Imaki R, [Toyo-oka T](#), [Izumi T](#). Usefulness of a sample prognostication score in prediction of the progresses of patients with out-of-hospital cardiac arrest. Ishikawa S, *Int.Heart Journal*, 54:362-70, 2013.
8. Aoyama N, Imai H, ...[Izumi T](#). Therapeutic strategy using extracorporeal life support, including appropriate indication, management, limitation and timing of switch to ventricular assist device in patients with acute myocardial infarction. *J Artif Organs*. 17:33-41, 2014.
9. Nabeta T, Inomata T, ...[Izumi T](#). Baseline cardiac magnetic resonance imaging versus baseline endomyocardial biopsy for the prediction of left ventricular reverse remodeling and prognosis in response to therapy in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Heart Vessels*. 2013 (in press).
10. Hori M, Matsumoto M, ...[Izumi T](#), *et al.*, Rivaroxaban versus warfarin in Japanese patients with nonvalvular atrial fibrillation in relation to the CHADS2 score: a subgroup analysis of the J-ROCKET AF trial. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 23:379-83, 2014.
11. Nishinari M, Shimohama T, ...[Izumi T](#). Two-week interval optical coherence tomography: imaging evidence on neointimal coverage completion after implantation of the endeavor zotarolimus-eluting stent. *Catheter Cardiovasc Interv*. 82: E871-8, 2013.
12. Kameda R, Yamaoka-Tojo M, ...[Izumi T](#). Soluble Fms-like tyrosine kinase 1 is a novel predictor of brain natriuretic peptide elevation. *Int Heart J*. 54:133-9, 2013.
13. Takeuchi I, Fujita H, ...[Izumi T](#). Initial experience of mobile cloud ECG system contributing to the shortening of door to balloon time in an acute myocardial infarction patient. *Int Heart J*. 54:45-7, 2013.
14. Fujiishi T, Koitabashi T, ...[Izumi T](#). Prosthetic mitral valve endocarditis with left atrial dissection. *Circ J*. 77:1585-6, 2013.
15. Yamamoto S, Matsunaga A, ..[Izumi T](#). Walking speed in patients with first acute myocardial infarction who participated in a supervised cardiac rehabilitation program after coronary intervention. *Int Heart J*. 53:347-52, 2012.
16. Satoh A, Niwano S, [Izumi T](#). Prediction of inappropriate implantable cardioverter-defibrillator therapies through parameters obtained in a simple exercise stress test. *Int Heart J*. 53:276-81, 2012.
17. [Izumi T](#), Nishii M. Diagnostic and prognostic biomarkers in acute myocarditis. Interleukin-10. *Herz*. 37: 627-31, 2012.
18. Nishinari M, Aoyama N, [Izumi T](#), *et al.*, Phosphoglucomutase activity as a novel biomarker in patients with acute myocardial infarction. *Circ J*. 76:2197-203, 2012.
19. Niwano S, Hirasawa S, [Izumi T](#). Cardioprotective effects of sarcolemmal and mitochondrial K-ATP channel openers in an experimental model of autoimmune myocarditis. Role of the reduction in calcium overload during acute heart failure. *Int Heart J*. 53:139-45, 2012.
20. Kiryu M, Niwano S, [Izumi T](#). Angiotensin II-mediated up-regulation of connective tissue growth factor promotes atrial tissue fibrosis in the canine atrial fibrillation model. *Europace*. 14:1206-14, 2012.

21. Murakami M, Niwano S, Izumi T. Evaluation of the impact of atrial fibrillation on re-hospitalization events in heart failure patients in recent years. *J Cardiol.* 60:36-41, 2012.
22. Kamiya K, Mezzani A, Izumi T, *et al.*, Effects of electrical muscle stimulation in a left ventricular assist device patient. *Int J Cardiol.* 160:e44-5, 2012.
23. Aoyama Y, Niwano S, Izumi T. Repetitive evaluation of fibrillation cycle length predicts the efficacy of bepridil for interruption of long-lasting persistent atrial fibrillation. *Int Heart J.* 52:353-8, 2011.
24. Inomata T, Izumi T, *et al.*, Tolvaptan Investigators. Phase III clinical pharmacology study of tolvaptan. *Cardiovasc Drugs Ther.* 25 (Suppl 1) :S57-65, 2011.
25. Maekawa E, Inomata T, Izumi T. Prognostic significance of right ventricular dimension on acute decompensation in chronic left-sided heart failure. *Int Heart J.* 52:119-26, 2011.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Toyo-oka T, Toyo-oka L, Richter M, Tanaka T, Nakajima T, Kostin S, Izumi T, Ono M, Schaper J, Tokunaga K. An overview of the bioinformatics and a new concept of BWAS. Medimond Press, 2012 年 7 月、第 17 回、心臓病学会国際会議、豊岡が A.Fleckenstein 賞授与・記念講演(Toronto, Canada)。抄録は 2013 年出版された。

〔図書〕(計 2 件)

1. Toyo-oka T, Tanaka T, Toyo-oka L, Tokunaga, K. Multidisciplinary approach to genome-wide association study for heart failure based on the different ethnicity. In “*Genes and Cardiovascular Function*“.

Ostadal B. *et al.*, eds, In “Genes and cardiovascular function”, Springer Press, Heidelberg, pp85-92, 2011..

2. Toyo-oka L, Izumi T, Kostin S, Tanaka T, J. Schaper, Toyo-oka, T., Bigenome analysis to provide genetic evidence for divergent features of heart failure and metabolic syndrome. *Proceedings of IWBBIO Meeting*, pp65-67, 2013.

〔図書〕(計 2 件)

1. Toyo-oka T, Tanaka T, Toyo-oka L, Tokunaga, K. Multidisciplinary approach to genome-wide association study for heart failure based on the different ethnicity. In “*Genes and Cardiovascular Function*“.
- Ostadal B. *et al.*, eds, In “Genes and cardiovascular function”, Springer Press, Heidelberg, pp85-92, 2011..
2. Toyo-oka L, Izumi T, Kostin S, Tanaka T, J. Schaper, Toyo-oka, T., Bigenome analysis to provide genetic evidence for divergent features of heart failure and metabolic syndrome. *Proceedings of IWBBIO Meeting*, pp65-67, 2013.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

下記特許は 2012 年、北里大学・医学部・研究支援室に申請依頼して、学内審査の結果、「申請に該当しない」と、却下された後、筆者が独自に申請したものである。

名称：核酸検出法

発明者：豊岡 照彦

権利者：豊岡 照彦

種類：JPO-PAS

番号：PCT/JP2012/075420

出願年月日：01 October 2012.

国内外の別：国内、および国外

2014 年 4 月 10 日、国際公開された。

国際公開番号：WO 2014/054103 A1

国内外の別：国内、および国外

6 . 研究組織

(1)研究代表者

豊岡 照彦 (TOYO-OKA, Teruhiko)
北里大学・医療系研究科・客員教授
研究者番号：00146151

(2)研究分担者

和泉 徹 (IZUMI, Tohru)
北里大学・名誉教授
研究者番号： 80143775

許 俊鋭 (KYO, Shunei)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：30153232