

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670172

研究課題名(和文) 遺伝子変異に起因する細胞内分子動態異常に着目した心筋機能の制御

研究課題名(英文) Strategy for regulation of cardiac functional defects due to the abnormality in molecular distribution caused by gene mutations

研究代表者

木村 彰方 (Kimura, Akinori)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：60161551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：心筋症や不整脈の病因となる分子の代謝・分布異常について、その分子メカニズムの解明と異常を是正する手法の開発を目的とした。肥大型心筋症の病因となる3種のCARP変異がそれぞれ異なる心筋収縮機能障害をもたらすこと、タイチン変異がMURF1の結合増強とユビキチン化増強を来すことを見出した。拡張型心筋症の病因となるLMNA変異およびFHOD3変異がSRF核内移行制御異常を介して心筋リモデリング異常をもたらすことを解明した。また、不整脈について、Kv1.7あるいはNav1.5チャネルの細胞内輸送障害を解除する低分子化合物の候補を探索し、病因CALM2変異、MYH6変異による機能異常を解明した。

研究成果の概要(英文)：We investigated functional impacts of disease-associated mutations in the molecular pathogenesis of cardiac muscle diseases, cardiomyopathy and arrhythmia. Three cardiomyopathy-associated CARP mutations caused fundamentally different functional impairments, although they commonly increased binding to titin. Two titin mutations increased binding ability to MURF1 and induced ubiquitination of titin. LMNA and FHOD3 mutations impaired the regulation of SRF-dependent gene expression via different mechanisms, i.e. androgen receptor-coupled nuclear translocation of SRF and actin dynamics-dependent SRF activation, respectively. We tried to find chemical compounds to restore the arrhythmia-causing functional defects of Kv1.7 and Nav1.5 and obtained about 50 candidate compounds. We found novel arrhythmia-associated mutations in CALM2 and MYH6 and revealed the functional alterations caused by the mutations, which were not directly associated with channel molecules.

研究分野：人類遺伝学

キーワード：遺伝学 遺伝子 ゲノム 循環器・高血圧

## 1. 研究開始当初の背景

心筋機能異常に起因する心筋症はしばしば不整脈を合併し、これに基づく突然死を来す。心筋症の原因は従来不明であったが、近年の遺伝学的解析により、サルコメア構成要素やZ帯-I帯構成要素の遺伝子異常が病因となることが明らかとなっている。一方、特に誘因なく突然死を来す不整脈についても、チャンネル分子の遺伝子異常が原因となることが判明している。また、チャンネル異常が心筋症の原因となることや、Z帯構成要素異常が不整脈の原因となることが明らかにされるなど、心筋症と不整脈には原因論上のオーバーラップがある。すなわち、我々を含む国内外の研究者らによる病因変異の探索から、心筋の収縮機能制御と刺激伝導機能制御には機能連関があることが判明している。しかしながら、それぞれの病態発現において遺伝子異常が寄与する分子機序については不明な点が多い。我々は、心筋症や不整脈などの新規原因遺伝子とその変異による機能異常を多数世界に先駆けて解明したが、遺伝子変異に起因する疾患には一般に根治療法がなく、有効な治療・予防法も少ない。一方、心筋症や不整脈の原因となる機能異常として、機能分子の構造そのものには異常がないが、他のタンパクとの結合性異常が生じることなどで、細胞内での輸送異常や細胞内での安定性異常を来す場合もある。このようなことから、心筋疾患では、心筋機能に直接関わる分子の構造異常が病因になる場合と、当該分子の輸送・代謝・発現性などの異常が病因となる場合があると言える。

## 2. 研究の目的

心筋症や不整脈を中心とする遺伝子異常に起因する心筋疾患の病因となる異常のうち、サルコメア構造タンパクやチャンネル分子には異常がないが、それらの細胞内分子の代謝異常や分布異常について、その異常を来たす分子メカニズムを解明するとともに、その異常を是正する手法を開発することを目的とする。具体的には、心筋収縮機能修飾遺伝子の変異に起因するサルコメア代謝異常およびチャンネル機能修飾遺伝子の変異に起因するチャンネル分子細胞内輸送異常に着目し、それらの機能異常をもたらすメカニズムを明らかにするとともに、心筋のサルコメア・サルコレンマ要素間の結合性に影響する機能修飾分子を探索するなど、心筋機能の構築・維持に関わる分子機序を解明する。

## 3. 研究の方法

心筋疾患の病因となる細胞内分子代謝異常のメカニズムを解明するため、心筋症および不整脈患者における病因変異を同定し、変異に起因する機能異常を分子生物学的、生化学的、細胞生物学的に *in vitro* で解析するとともに、遺伝子改変マウスなどを用いて *in vivo* で検討する。また、心筋収縮機能修飾遺伝子

の変異に起因するサルコメア代謝異常およびチャンネル機能修飾遺伝子の変異に起因するチャンネル分子細胞内輸送異常に着目し、病因変異の存在下にタンパクタンパク間の結合性の変化などの機能異常を是正する分子や低分子化合物を探索する。特に、心筋症の病因変異がもたらすタイチン - CARP およびタイチン - MURF の結合性変化など、サルコメア要素間連関異常による心筋サルコメア整合性異常の機能的意義を解析するとともに、その是正方策を検討する。一方、Kv1.7 や Nav1.5 などの心筋細胞イオンチャンネルの細胞表面発現抑制が不整脈の原因となることから、発現抑制機序を解明するとともに、細胞生物学的なスクリーニング系を構築し、発現抑制を解除する低分子化合物を探索するなど、チャンネル分子の細胞内分布以上の是正方策を探索する。

## 4. 研究成果

### (1) 肥大型心筋症関連変異の解析

CARP は心筋細胞内でタイチンやミオパラジン等の細胞質構造タンパクと結合するとともに、核内に移行して転写活性化をもたらす。我々は以前に肥大型心筋症の病因となる3種のCARP変異を見出し、それらがいずれもタイチンとの結合性を増強することを報告している。そこでラット心筋細胞を用いた心筋再構築系に正常ないし変異CARP遺伝子導入し、それぞれの変異が心筋収縮パラメータに与える影響を検討したところ、1種の変異(T123M)は収縮力を増強したが、他の2種の変異(P52A, I280V)は細胞質内での安定性が著しく低下することを明らかにした。さらにタンパク分解阻害剤存在下での検討から、I280Vは弛緩速度を遅延させることを見出した。このことから、CARP変異はタイチン結合性増強とは異なるメカニズムで心筋収縮パラメータに影響することが判明したが、個々のパラメータ変化とCARP-タイチン結合性変化との間には明確な対応関係がなかった。

一方、上記とは別の患者・家系に、肥大型心筋症の病因となる2種類のタイチン変異(S30186A, D30994N)を見出した。これらの変異がマップされるIgドメインを用いたアッセイ系で、当該領域に変異がない場合にはMURF1との結合性を示さないが、変異が存在するといずれの変異ともMURF1との結合性を増強し、タイチンのユビキチン化が増強することが明らかになった。また、これらの領域のアミノ酸配列を比較したところ、すでに知られているMURF1結合ドメイン構造とは相同性を示さず、新たなドメイン構造の存在が示唆された。このことは、結合ドメイン構造の可塑性を示すものであり、構造変化がないMURF1がタイチン側の変異に起因した細胞内分布の変化によって、タイチン代謝を変化させ、結果として心筋症病態をもたらすことを示唆する。

これらとは別に、既知の原因遺伝子に病因変異が同定されていない家系を対象としたエクソーム解析から、ゲノム DNA のメチル化維持に関わる遺伝子にミスセンス変異 (G454D) を見出した。このミスセンス変異は家系内の患者 6 名全員が保有していた。そこで、他の肥大型心筋症患者集団についても当該遺伝子の変異を検索したところ、5 名の患者に別のミスセンス変異 (R296T) を同定した。ついで、これらのミスセンス変異を有する患者 10 名 (G454D 陽性患者 5 名、R296T 陽性患者 5 名) および健常者 6 名を対象にして、全ゲノムの CpG サイトのメチル化パターンを検討したところ、変異を有する患者に共通してゲノム DNA のメチル化の程度が有意 ( $p < 0.001$ ) に異なる座位を多数見出した。とりわけ、G454D 陽性患者平均および R296T 陽性患者平均のいずれもが健常者平均の 80% 未満にメチル化が低下している座位を 6 箇所、130% 以上に亢進している座位を 23 箇所出来たため、これらはサルコメア構造タンパク異常によらない心肥大制御の新たなメカニズムを解明する手がかりとなると考えられた。

### (2) 拡張型心筋症関連変異の解析

家族性拡張型心筋症家系を対象とした変異解析によって LMNA 変異 (R225X) および FHOD3 変異 (Y1249N) を同定した。LMNA 変異を有する家系では、変異陽性者のうち男性患者の方が早期に発症し、重症であることから、変異に起因する病態を修飾する性差機序の存在が示唆された。また、LMNA 変異 (H222P) ノックインマウスにおいても、病態発現および生存予後における性差が観察されることから、マウスを用いた性腺除去実験および性ホルモン投与実験を行った。雄ノックインマウスを去勢すると雌ノックインマウスと同程度に生存期間が延長し、去勢マウスにアンドロゲン (男性ホルモン) を投与すると生存予後が不良になった。また、雄ノックインマウスにアンドロゲン受容体 (AR) 阻害剤を投与すると生存予後が改善した。さらに、雌ノックインマウスにアンドロゲンを投与すると生存予後が悪化した。また、これらの生存予後の変化は病理像 (心拡大、心筋細胞の脱落、心筋線維化亢進など) の変化と一致したことから、男性ホルモンが心筋症病態悪化因子であることが判明した。また、ラット心筋細胞への遺伝子導入実験から、R225X および H222P を導入した細胞では、男性ホルモン非存在下でも、いずれも AR が核内に集積することが判明した。このような AR の核内集積は、変異陽性患者の心筋組織や変異ノックインマウスの心筋組織でも観察された。さらに、アンドロゲンの存在下で AR は FHL2 と会合して核内に移行すること、siRNA を用いた実験から AR の核内集積は FHL2 に依存すること、AR-FHL2 の核内移行は SRF の核内移行を促進することが明らかとなった。また、ノックインマウスの心臓に

おいて、アンドロゲンに依存した心不全病態の進行は、心筋リモデリング遺伝子の転写促進と一致していることが判明した。前述のとおり、ノックインマウスを用いた実験で、AR 阻害剤の投与によって心筋症病態を改善可能であったことは、男性ホルモンと AR との結合性を薬剤で阻害することで心不全病態の悪化を抑制することが可能であることを示す。これとは別に、拡張型心筋症患者に見出された FHOD3 変異について生化学的、細胞生物学的解析を行った結果、FHOD3 変異はアクチン動態依存性の SRF 転写活性化を抑制することが判明した。これらのことは、SRF 活性化の亢進および減弱のいずれもが、心筋リモデリング異常を通じて心不全病態をもたらすことを示す。

### (3) 不整脈関連変異の解析

我々は以前にチャネル分子自体には大きな構造変化がないが不整脈を来たす変異として、KCNQ1 チャネルの細胞内ドメイン変異 (delV595 および P631fs/19) および SLMAP 変異 (V269I および E710A) を報告した。前者は Kv7.1 チャネル、後者は Nav1.5 チャネルの細胞内輸送を障害し、結果としてそれぞれのチャネル機能を障害する。そこで、これらの変異を安定的に発現する HEK 細胞を作製し、種々の薬剤や低分子化合物による機能回復を検討した。Kv7.1 については、約 9000 種類の低分子化合物をスクリーニングし、delV595 および P631fs/19 による機能障害を解除する候補として、それぞれ 54 および 41 種の低分子化合物を得た。ついで、これらについて詳細な検討を行ったが、いずれも十分な機能回復をもたらさなかった。また、熱処理、EDTA 処理、COPII 機能阻害剤を用いた検討を行ったが、Kv1.7 機能の回復は観察されなかった。一方、SLMAP 変異による Nav1.5 輸送障害に関しては、SLMAP と Nav1.5 との直接の結合は観察されなかった。熱、EDTA、COPII 阻害剤では、SLMAP 変異による Nav1.5 輸送障害は改善しなかったことから、前述の Kv1.7 輸送障害と同様に、ER 障害を介した Nav1.5 輸送異常ではないと考えられた。

これらとは別に、不整脈患者・家系を対象とした検討によって、チャネル分子自体には異常がない患者に、CALM2 変異 (D134H, N98S, D132E, Q136P, N98I) あるいは MYH6 変異 (A1101V) を見出した。生化学的解析により、これらの CALM2 変異はいずれも Ca 結合能が低下していた。一方、形質転換細胞を用いた実験から、MYH6 変異はミオシン結合タンパク C との結合性を増強させるとともに、サルコメア整合性異常をもたらす、また細胞間電動速度の低下を来たすことが判明した。

さらに、チャネル遺伝子には変異が認められない家族性不整脈多発家系を対象とした解析から、これらの変異とは別の遺伝子 X の変異を同定しており、疾患原因遺伝子の多様性と機能変化のさらなる多様性が明らかと

なった。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1. Ishikawa T, Jou CJ, Nogami A, Kowase S, Arrington CB, Barnett SM, Harrell DT, Arimura T, Tsuji Y, Kimura A, Makita N. A novel mutation in alpha-myosin heavy chain gene is associated with sick sinus syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2015; 8(2): 400-408. (査読有)  
(doi: 10.1161/CIRCEP.114.002534)
2. Makita N, Yagihara N, Crotti L, #Johnson CN, Beckmann BM, Roh MS, Shigemizu D, Lichtner P, Ishikawa T, Aiba T, Homfray T, Behr ER, Klug D, Denjoy I, Mastantuono E, Theisen D, Tsunoda T, Satake W, Toda T, Nakagawa H, Tsuji Y, Tsuchiya T, Yamamoto H, Miyamoto Y, Endo N, Kimura A, Ozaki K, Motomura H, Suda K, Tanaka T, Schwartz PJ, Meitinger T, Käab S, Guichney P, Bhuiyan ZA, Shimizu W, Watanabe H, Chazin WJ, George AL. Novel calmodulin (CALM2) mutations associated with congenital arrhythmia susceptibility. *Circ Cardiovasc Genet.* 2014; 7(4): 466-474. (査読有)  
(doi: 10.1161/CIRCGENETICS.113.000459)
3. Arimura T, Takeya R, Ishikawa T, Yamano T, Matsuo A, Tatsumi T, Nomura T, Sumimoto H, Kimura A. Dilated cardiomyopathy-associated FHOD3 variant impairs the ability to induce activation of transcription factor SRF. *Circ J.* 2013; 77(12): 2990-2996. (査読有)  
(doi: 10.1253/circj.CJ-13-0255)
4. Arimura T, Onoue K, Takahashi-Tanaka Y, Ishikawa T, Kuwahara M, Setou M, Shigenbu S, Yamaguchi K, Bertrand AT, Machida N, Takayama K, Fukusato M, Tanaka R, Somekawa T, Nakano T, Yamane Y, Kuba K, Imai Y, Saito N, Bonne G, Kimura A. Nuclear accumulation of androgen receptor in gender difference of dilated cardiomyopathy due to lamin A/C mutations. *Cardiovasc Res.* 2013; 99(3): 382-394. (査読有)  
(doi:10.1093/cvr/cvt106)
5. Crocini C, Arimura T, Reischmann S, Eder A, Braren I, Hansen A, Eschenhagen T, Kimura A, Carrier L. Impact of ANKRD1 mutations associated with hypertrophic cardiomyopathy on contraction parameters of engineered heart tissue. *Basic Res Cardiol.* 2013; 108(3): 349. (査読有)  
(doi: 10.1007/s00395-013-0349-x)

〔学会発表〕(計3件)

1. 林丈晴、谷本幸介、木村彰方. 遺伝性心

筋症変異スクリーニングシステムの構築.

日本人類遺伝学会第59回大会  
2014.11.20 東京

2. 稲垣夏子、林丈晴、武井康悦、近森大志郎、谷本幸介、山科章、木村彰方. 心室中部閉塞型肥大型心筋症の病因変異探索. 日本人類遺伝学会第59回大会  
2014.11.20 東京
3. 木村彰方. 心不全・突然死の遺伝子. 第9回 四大学連合文化講演会 2014.10.10 東京
4. 木村彰方, 有村卓朗, 武谷立, 石川泰輔, 山野哲弘, 松尾あき子, 辰巳哲也, 野村哲矢, 住本英樹. 家族性拡張型心筋症の新規原因遺伝子の同定: 疾患関連 FHOD3 変異は SRF 活性化能を障害する. 日本人類遺伝学会第58回大会, 2013年11月21日, 仙台.

〔図書〕(計2件)

1. 木村彰方: 肥大型心筋症の遺伝子診断. 呼吸と循環 2013; 61(6):581-587.
2. 木村彰方: 心筋症 Up to date-遺伝子異常の関連を識る. Heart View 2013; 17(3):258-264.

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

木村 彰方 (KIMURA, Akinori)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授  
研究者番号: 60161551