

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860589

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュを用いた肥大型心筋症の発症、進展機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of the pathogenesis in hypertrophic cardiomyopathy by using zebrafish models.

研究代表者

竇達 明彦 (Hodatsu, Akihiko)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：00623662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：肥大型心筋症例で見いだされた遺伝子変異を再現するため、ゼブラフィッシュ胚にMYBPC3に対するアンチセンスモルフォリノ及びゼブラフィッシュMYBPC3 mRNAをインジェクションし、心臓表現型を解析した。野生型mRNAのみ、野生型mRNAおよびA745D mRNA、A745DおよびR815Q mRNAをインジェクションし、それぞれ野生型、単独変異モデル、複合ヘテロ接合体モデルを作成した。モルフォリノ単独群に比し、野生型モデルおよび単独変異モデルは心室径、心室内径短縮率、心房面積、心拍数に有意な変化を認めなかったが、複合ヘテロ接合体モデルでは有意に心室の拡大、心拍数の増加を認めた。

研究成果の概要(英文)：MYBPC3 antisense morpholino oligonucleotide (MO) and MYBPC3 mRNA were injected in one cell stage zebrafish embryos to assess the functional consequences of the MYBPC3 mutations found in human hypertrophic cardiomyopathy patients. Wild type MYBPC3 mRNA, wild type and A745D mutant mRNA, or double mutant mRNA (A745D and R815Q mutants) were co-injected. They corresponds wild type, single mutation (heterozygote) and compound heterozygote, respectively. Ventricular dimension and heart rate were similar between the MYBPC3 MO group and the MYBPC3 MO with WT mRNA group or the MYBPC3 MO with Ala745Asp mRNA and WT mRNA group, whereas ventricular dimension and heart rate were significantly increased in the MYBPC3 MO with Ala745Asp mRNA and Arg815Gln mRNA group compared with the MYBPC3 MO group.

研究分野：循環器内科

キーワード：肥大型心筋症 ゼブラフィッシュ 遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

心不全は、一旦治療抵抗性に陥ると、5年間の死亡率が約50%に及ぶ予後不良な症候群である。心不全治療には一定の前進が見られるが、依然として心不全患者の予後は不良である。それは一つには心不全発症の仕組みに関する分子機構の解明が十分でないことも一因と考えられる。心筋肥大、繊維化といった心不全の典型を示す疾患として肥大型心筋症に着目し、進展にかかわる遺伝子群を網羅的に探索する必要があると考えた。そこで、短期間に肥大型心筋症を発症し、より効率的に左室収縮不全・心不全発症進展に関わる分子を *in vivo* においてスクリーニング可能とする肥大型心筋症ゼブラフィッシュモデルの確立を目指した。ゼブラフィッシュ胚は無色透明であり、心臓の構造や拍動を顕微鏡下に直接観察することが可能である。また、アンチセンス・モルフォリノリゴを用いた標的遺伝子ノックダウン後、72時間以内に心臓の表現型を観察し得る。肥大型心筋症ゼブラフィッシュを用いて心肥大や心筋線維化の細胞内伝達経路のスクリーニングを行い次世代型の心不全治療法の確立を目指すものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は

(1) 短期間で肥大型心筋症を発症するゼブラフィッシュモデルの作成を目指すこと、(2) 肥大型心筋症ゼブラフィッシュモデル作成にあたっては、実際に肥大型心筋症患者で同定された遺伝子変異を導入すること、(3) 肥大型心筋症ゼブラフィッシュモデルを用いて高効率に心筋肥大、線維化に関わる機序を解明し治療法の開発を目指すことである。

3. 研究の方法

(1) 肥大型心筋症ゼブラフィッシュモデルの作成

MYBPC3 の翻訳開始領域に対するアンチセンスモルフォリノオリゴのマイクロインジェクションを行い内因性 MYBPC3 のノックダウンを行うことにより心筋肥大や拡張障害といった肥大型心筋症にみられる心臓表現型が観察される (*J Am Heart Assoc* 2:e000231, 2013.)。同時にゼブラフィッシュ MYBPC3 mRNA をインジェクションした。野生型モデルは野生型 mRNA のみ、単独変異モデルは野生型 mRNA および A745D(V762D に相当) mRNA を、複合ヘテロ接合体モデルは A745D および R815Q(R820Q に相当) mRNA をインジェクションした。

(2) ゼブラフィッシュにおける心機能解析
心臓特異的に EGFP を発現するゼブラ

フィッシュを用い、蛍光顕微鏡を用いて心室系、心室内径短縮率、心房面積、心拍数を計測する。

(3) 候補遺伝子のモルフォリノリゴによるノックダウン、mRNA によるレスキュー

肥大、繊維化に至るパスウェイの候補遺伝子に対してモルフォリノリゴによるノックダウンや、mRNA によるレスキューを行うことにより、対照群と比較して HCM モデルゼブラフィッシュの心臓表現型の重症度に変化が認められるか否かを解析する。

4. 研究成果

(1) 肥大型心筋症ゼブラフィッシュモデルの心臓表現型の解析

モルフォリノ単独群に比し、野生型モデル、単独変異モデル、複合ヘテロ接合体モデルでは有意に生存率が改善した。また、モルフォリノ単独群に比し、野生型モデルおよび単独変異モデルは心室径、心室内径短縮率、心房面積、心拍数に有意な変化を認めなかったが、複合ヘテロ接合体モデルでは有意に心室の拡大、心拍数の増加を認めた(図1, 2)。

図1. ゼブラフィッシュの心臓表現型

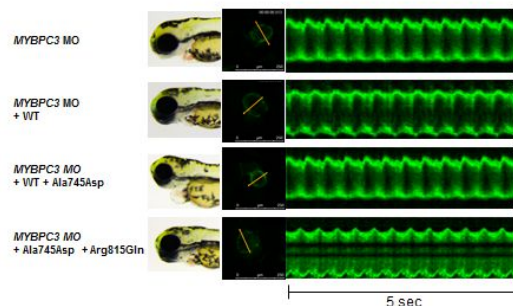
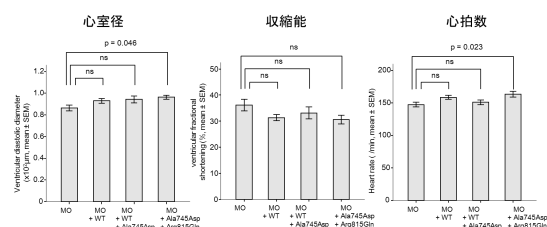


図2. 心室径、心室短縮率、心拍数の変化



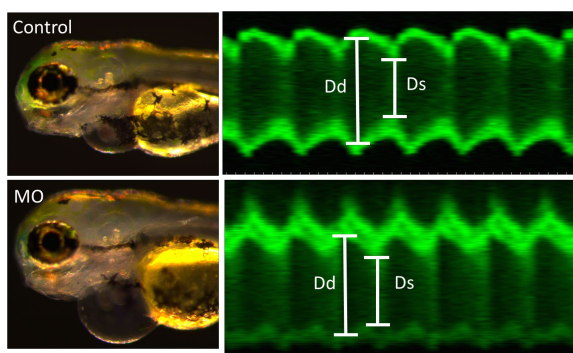
この結果は2014年欧州心臓病学会、2015年アメリカ心臓病学会で発表し、大きな反響を得た。またこの結果を含む論文が欧文誌に採択された。(雑誌論文6)

(2) パスウェイの候補遺伝子のノックダウンによる心臓表現型の変化

肥大、繊維化進展に関与する候補としてミトコンドリア ATP 合成酵素のサブユニットに着目した。同遺伝子のノックダウンにより、

心室短縮率の低下、心房径の拡大といった病的リモデリングがみられた(図3)。

図3. ATP合成酵素関連遺伝子のノックダウンによる心臓表現型の変化



さらに、マイクロアレイによる解析ではナトリウム利尿ペプチドをコードする *nppa* 遺伝子の有意な発現増加やサルコメア関連遺伝子の発現低下が見いだされた。また MAPK ファミリー、アポトーシス関連遺伝子の発現の変化が見られた。しかしながら、mouse neonatal cardiomyocyte を用いた網羅的遺伝子発現解析では同様の変化を確認しえなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

- (1) Nomura A, Tada H, Teramoto R, Konno T, Hodatsu A, Won HH, Kathiresan S, Ino H, Fujino N, Yamagishi M, Hayashi K., Whole exome sequencing combined with integrated variant annotation prediction identifies a causative myosin essential light caing variant in hypertrophic cardiomyopathy. *J Cardiol*. 査読有, 67: 133-139, 2016 doi: 10.1016/j.jjcc.2015.09.003.
- (2) Hayashi K, Konno T, Tada H, Tani S, Liu L, Fujino N, Nohara A, Hodatsu A, Tsuda T, Tanaka Y, Kawashiri MA, Ino H, Makita N, Yamagishi M., Functional Characterization of Rare Variants Implicated in Susceptibility to Lone Atrial Fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 査読有, 8: 1095-1104, 2015 doi: 10.1161/CIRCEP.114.002519.
- (3) Konno T, Hayashi K, Fujino N, Oka R, Nomura A, Nagata Y, Hodatsu A, Sakata K, Furusho H, Takamura M, Nakamura H, Kawashiri MA, Yamagishi M., Electrocardiographic QRS Fragmentation as a Marker for Myocardial Fibrosis in Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 査読有, 26: 1081-1087, 2015 doi: 10.1111/jce.12742.
- (4) Fujita T, Konno T, Yokawa J, Masuta E, Nagata Y, Fujino N, Funada A, Hodatsu A, Kawashiri MA, Yamagishi M, Hayashi

K., Increased extent of myocardial fibrosis in genotyped hypertrophic cardiomyopathy with ventricular tachyarrhythmias. *J Cardiol*. 査読有, 66: 63-68, 2015

doi: 10.1016/j.jjcc.2014.10.002.

- (5) Nagata Y, Konno T, Fujino N, Hodatsu A, Nomura A, Hayashi K, Nakamura H, Kawashiri MA, Yamagishi M., Right ventricular hypertrophy is associated with cardiovascular events in hypertrophic cardiomyopathy: evidence from study with magnetic resonance imaging. *Can J Cardiol*. 査読有, 31: 702-708, 2015 doi: 10.1016/j.cjca.2014.12.036.
- (6) Hodatsu A, Konno T, Hayashi K, Funada A, Fujita T, Nagata Y, Fujino N, Kawashiri MA, Yamagishi M., Compound heterozygosity deteriorates phenotypes of hypertrophic cardiomyopathy with founder MYBPC3 mutation: evidence from patients and zebrafish models. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 査読有 307: H1594-H1604, 2014. doi:10.1152/ajpheart.00637.2013.

〔学会発表〕(計4件)

- (1) Akihiko Hodatsu (他7名), Impact of Mutation Dosage on Phenotypes in Hypertrophic Cardiomyopathy with MYBPC3 Mutations; Evidence from Zebrafish models, 第79回日本循環器学会学術集会, 2015年4月24-26日, グランフロント大阪(大阪)
- (2) 宝達明彦 (他9名), ミオシン結合タンパクC複合ヘテロ接合性変異による肥大型心筋症の重症表現型~ゼブラフィッシュを用いた検討~, 第112回日本内科学会講演会, 2015年4月10-12日, みやこめっせ(京都)
- (3) Akihiko Hodatsu (他7名), Impact of Compound heterozygosity on Phenotypes of hypertrophic cardiomyopathy with MYBPC3 mutations; Evidence from zebrafish models, American College of Cardiology 64th Annual Scientific Session, 2015年3月14-16日, San Diego(USA)
- (4) Akihiko Hodatsu (他7名), A founder mutation of the myosin binding bprotein-C gene in hypertrophic cardiomyopathy and adverse outcomes with compound heterozygoity. European scoety of Cardiology Congress 2014, 2014年8月30日-9月3日, Barcelona(Spain)

〔その他〕

ホームページ

<http://intmed2.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竇達 明彦 (HODATSU AKIHIKO)

金沢大学・医学系・研究協力員

研究者番号：00623662

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

瀬口 理 (SEGUCHI OSAMU)

国立循環器病研究センター・病院・医師

研究者番号： 60570869