

平成30年 5月24日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09685

研究課題名(和文) 致死性不整脈を合併する心筋緻密化障害の網羅的遺伝子解析と発症機序の解明

研究課題名(英文) Genetic analysis and pathological role in ventricular noncompaction associated with fatal arrhythmia

研究代表者

市田 藤子 (Ichida, Fukiko)

富山大学・事務局・学長補佐

研究者番号：30223100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：心筋緻密化障害において、次世代シーケンサーを用いて、胎児心筋の発達や致死性不整脈にかかわる約80の遺伝子に関して網羅的解析を行い、患者由来のiPS細胞を樹立し、iPS細胞から分化誘導した心筋細胞を用いて機能解析を行い、心筋緻密化障害における致死性不整脈の発症機序を明らかにすることを試みた。その結果、患者の30%に遺伝子異常が認められ、遺伝子異常が心移植や突然死のリスク因子であることが判明した。また、患者由来iPS細胞から誘導した心筋細胞では、カルシウムハンドリングの脆弱性が明らかとなり、致死性不整脈の発症機序へのサルコメア遺伝子変異の役割が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We targeted and sequenced 80 genes related to cardiomyopathy in 102 LVNC patients using NGS. We identified variants in a significant proportion of cases (30%), which were associated with poor prognosis, and independent risk factor for adverse events including heart transplantation and sudden death. To elucidate the pathological role, we developed and studied human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) from a patient carrying a TPM1 p.Arg178His mutation, who underwent heart transplantation. These cells displayed pathological changes, with mislocalization of tropomyosin 1, causing disruption of the sarcomere structure in cardiomyocytes, and impaired calcium handling. Sarcomere genes are implicated as genetic triggers in the development of LVNC and fatal arrhythmia, regulating the expression of numerous genes involved in heart development, or modifying the severity of disease.

研究分野：小児循環器学

キーワード：心筋緻密化障害 遺伝子変異 サルコメア遺伝子 iPS細胞 次世代シーケンサー 致死性不整脈 心筋細胞 突然死

1. 研究開始当初の背景

心筋緻密化障害は、心室壁の過剰な網目状の肉柱形成と深い間隙を特徴とした心筋症で、難治性心不全や致死性不整脈の合併が高率にみられ、予後は不良である。心筋緻密化障害は、2006年AHAの提唱では、遺伝的要素が強い心筋症のカテゴリに分類されているが、QT延長症候群やカトミン感受性多形性心室頻拍などのイオンチャネル病も、同じカテゴリに分類されている。もはや、心筋症と不整脈は分離して考えることのできない”final common pathway”上にあることが提唱されている。私共も、心筋緻密化障害において、イオンチャネルのSCN5A遺伝子が合併する不整脈と密接な関連があることを報告した。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの心筋緻密化障害の臨床遺伝学的研究の集大成として、次世代シーケンサーを用いて、胎児心筋の発達や致死性不整脈にかかわる約80の遺伝子に関して網羅的解析を行い、遺伝子異常が判明した患者由来のinduced pluripotent stem cell(iPS細胞)を樹立し、iPS細胞から分化誘導した心筋細胞を用いて増殖分化能や機能解析を行い、心筋緻密化障害と高率に合併する致死性不整脈の発症機序を明らかにすることが、研究目的である。

3. 研究の方法

胎児心筋発達過程の異常に起因すると考えられている心筋緻密化障害において、次世代シーケンサーを用いて、心筋発生と致死性不整脈にかかわる約80の遺伝子に関して網羅的解析を行う。遺伝子異常が判明した患者由来のiPS細胞から誘導した心筋細胞を用いて、機能解析を施行する。具体的には、

- 全国調査と致死性不整脈を含む臨床像の検討
- 次世代シーケンサーを用いた心筋発生と致死性不整脈関連遺伝子の網羅的解析

患者血液からのiPS細胞を樹立し、心筋

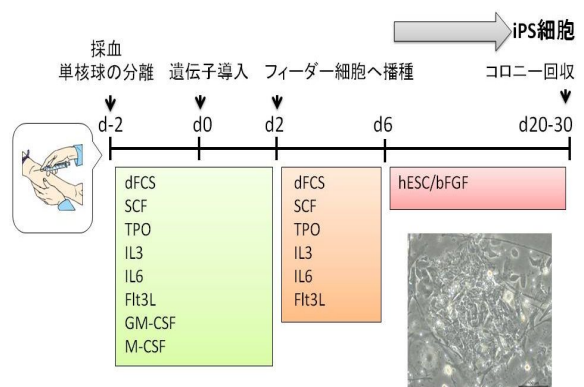
細胞への分化誘導

iPS細胞由来心筋細胞の関連遺伝子の分化増殖能、電気生理学的機能解析

患者血液サンプルからiPS細胞の樹立

採取したサンプルから、レンチウイルス^{*}クラーにより細胞のリプログラミングに必要な因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)を遺伝子導入し、iPS細胞を作成する(図3, Warlich, et al. Molecular Therapy, 2011)。得られたiPS細胞については機能解析で未分化性を確認の上、心筋細胞への分化に用いる。まず、全ての株からDNAを抽出しシーケンスを行い、患者に由来するiPS細胞に探索された遺伝子の変異が改変されていないことを確認する。さらに免疫蛍光染色法、リアルタイムPCR等により、樹立した全てのiPS細胞が万能性を示すことを確認する。また、テマトマ形成実験により、三胚葉全ての細胞へと分化する能力を持つことを明らかにする。さらには、核型分析を行い、樹立したiPS細胞に染色体異常のないことを確認する。

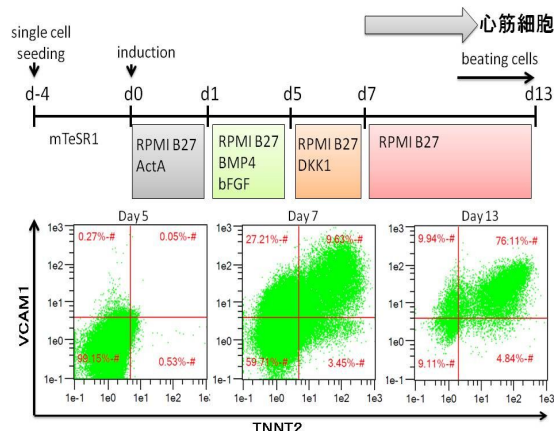
図3 iPS細胞の作成



iPS細胞から心筋細胞への分化誘導

iPS細胞を、Bone Morphogenetic Protein (BMP) およびその内因性阻害因子である Activin A、basic Fibroblast growth factor、Wnt 賦活剤および阻害剤を用いて、心筋細胞へと分化誘導する(図4, Uosaki, et al. Plos one, 2011)

図4 iPS細胞から心筋細胞への誘導



患者 iPS 細胞由来心筋細胞の機能評価

iPS 細胞由来心筋細胞の分化能評価:

野生株と患者由来株の間で分化能および形態的な表現において差異を生じるか、遺伝子発現レベルおよび蛋白の発現レベルを評価する。遺伝子発現レベルは real-time RT-PCR にて野生株と患者由来株 iPS 細胞由来心筋細胞の TnnT や NKX2.5 などの心筋特異的 mRNA の発現を比較検討する。蛋白の発現レベルは免疫蛍光染色およびウェスタンブロット法にて野生株と患者由来株 iPS 細胞由来心筋細胞の TnnT や NKX2.5 などの心筋特異的蛋白の発現を比較検討する。

iPS 細胞由来心筋細胞の増殖能およびアポトーシスの評価:

野生株と患者由来株の間で増殖能およびアポトーシスに差異を生じるか、Flow cytometry 法と免疫組織染色を行い評価する。増殖能に関しては、iPS 細胞由来心筋細胞を BrdU にて数時間培養し、BrdU を取り込ませた上で、細胞を回収し、抗 BrdU 抗体を用いて、BrdU 陽性細胞と非 BrdU 陽性細胞の比率を算出し、野生株と患者由来株間で比較検討する。アポトーシスに関しては、TUNEL 法を用いて、免疫染色を行い、野生株と患者由来株間で差異がないか解析する。

iPS 細胞由来心筋細胞の電気生理学的機能測定:

今回申請するパッチクランプ増幅器と倒立顕微鏡を用いて iPS 細胞由来心筋細胞からパッチクランプ法記録を行い、野生株と患者由来株の電気生理学的性質を比較し、催不整脈性の有無を検討する静電容量、ナトリウムおよびカルシウム等イオンチャネルの電流密度、活性化/不活性化/脱活性化/脱不活性化速度を検査する。また、64ch 細胞外電位記録システムを用いて活動電位の発

火頻度および持続時間を検査する。さらに、iPS 細胞由来心筋細胞に蛍光カルシウムイメージング法を適用し、心筋の収縮能に必要な細胞内カルシウムの動態を野生株と患者由来株で比較する。

4. 研究成果

H27,28 年度は、次世代シーケンサーを用いて、約 80 の遺伝子に関して網羅的解析を行なった結果、心筋緻密化障害患者の 30% に遺伝子異常が認められ、遺伝子異常が心移植や突然死のリスク因子であることを明らかにした。

H29 年度には、予後不良の TMP1 遺伝子変異を有する患者由来 iPS 細胞から心筋細胞を誘導し、機能解析を進め、カルシウムの動態を評価し、患者細胞においてカルシウムハンドリングの脆弱性が明らかとなった。

結論: 心筋緻密化障害と高率に合併する致死性不整脈の発症機序へのサルコメア遺伝子変異の役割が裏付けられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

- 1) Atsuko Imai, Yoshihito Kishita, Masakazu Kohda, Yukiko Yatsuka, Tomoko Hirata, Yosuke Mizuno, Hiroko Harashima, Keiichi Hirono, **Fukiko Ichida**, Atsuko Noguchi, Masayuki Yoshida, Chiho Tokorodani, Ritsuo Nishiuchi, Atsuhito Takeda, Akihiro Nakaya, Yasushi Sakata, Kei Murayama, Akira Ohtake, Yasushi Okazaki. Barth Syndrome: Different Approaches to Diagnosis A comprehensive diagnosis of Barth syndrome in patients with suspected mitochondrial disease *J Pediatr* 2018 Feb;193:256-260. doi: 10.1016/j.jpeds.2017.09.075. Epub 2017 Dec 15.
- 2) Hideyuki Nakaoka, Keiichi Hirono, Seiji Yamamoto, Ichiro Takasaki, Kei Takahashi, Koshi Kinoshita, Asami Takasaki, Mako Okabe, Wang, CE, Nariaki Miyao, Kazuyoshi Saito, Keijiro Ibuki, Sayaka Ozawa, Yuichi Adachi, **Fukiko Ichida**. MicroRNA-145-5p and microRNA-320a, encapsulated in endothelial microparticles, upregulate inflammatory cytokine expression levels and contribute to the progression of

- vasculitis in acute Kawasaki Disease. *Scientific Reports* 2018 Jan 17;8(1):1016. doi: 10.1038/s41598-018-19310-4.
- 3) Ryosuke Yokoyama, Koshi Kinoshita, Yukiko Hata, Masayoshi Abe, Kenta Matsuoka, Keiichi Hirono, Masanobu Kano, Makoto Nakazawa, Fukiko Ichida, Naoki Nishida, Toshihide Tabata, A mutant HCN4 channel in a family with bradycardia, left bundle branch block, and left ventricular noncompaction *Heart and Vessels* 2018 Jan 18. doi: 10.1007/s00380-018-1116-6. [Epub ahead of print]
 - 4) Hashimoto, Ikuo; Ichida, Fukiko: Left ventricular fiber structure and myocardial deformation for assessment of cardiotoxicity. *Circ J* 2018; 82: 648-649
 - 5) Mitsuhiro Fujino, Etsuko Tsuda, Keiichi Hirono, Masanori Nakata, Heima Sakaguchi, Manabu Matsumoto, Hatsue Ueda, Yukiko Hata, Fukiko Ichida The *TNNI3* Arg192His Mutation in a 13-years-old Girl with Left Ventricular Noncompaction. *Journal of cardiology cases* 2018 in press
 - 6) Hirono K, Sakai T, Hata Y, Nishida N. The presence of multiple variants affects the clinical phenotype and prognosis in LVNC after surgery The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 155:e101-e109. 2018
 - 7) Wang C, Hata Y, Hirono K, Takasaki A, Ozawa SW, Nakaoka H, Saito K, Miyao N, Okabe M, Ibuki K, Nishida N, Origasa H, Yu X, Bowles NE, Ichida F; for LVNC Study Collaborators. A Wide and Specific Spectrum of Genetic Variants and Genotype-Phenotype Correlations Revealed by Next-Generation Sequencing in Patients with Left Ventricular Noncompaction. *J Am Heart Assoc* 2017 Aug 30;6(9). pii: e006210. doi: 10.1161/JAHA.117.006210. PMID: 28855170
 - 8) Yamaguchi Y, Mizumaki K, Hata Y, Sakamoto T, Nakatani Y, Kataoka N, Ichida F, Inoue H, Nishida N. Latent pathogenicity of the G38S polymorphism of KCNE1 K+ channel modulator. *Heart Vessels*. 2017;32:186-192. doi: 10.1007/s00380-016-0859-1. Epub 2016 Jun 2. PMID:27255646
 - 9) Wang, Ce; Takasaki, Asami; Ozawa, Sayaka; Nakaoka, Hideyuki; Okabe, Mako; Miyao, Nariaki; Saito, Kazuyoshi; Ibuki, Keiichi; Hirono, Keiichi; Yoshimura, Naoki; Yu, Xian; Ichida, Fukiko Long-term prognosis of patients with Left Ventricular Noncompaction: A Comparison between Infantile and Juvenile Types *Circ J* 2017;81:694-700 doi: 10.1161/JAHA.117.006210
 - 10) Wang C, Yu X, Ichida F. Survival in Young Patients With Noncompaction May Not Only Depend on Cardiac But Also on Neuromuscular Comorbidity - Reply. *Circ J*. 2017 Jul 25;81(8):1239. doi: 10.1253/circj.CJ-17-0544. Epub 2017 Jul 8.
 - 11) Ayako Chida; Kei Inai; Hiroki Sato; Eriko Shimada; Tsutomu Nishizawa; Mitsuyo Shimada; Michiko Furutani; Yoshiyuki Furutani; Yoichi Kawamura; Masaya Sugimoto; Jun Ishihara; Masako Fujiwara; Takashi Soga; Masatoshi Kawana; Shinya Fuji; Shigeru Tateno; Kenji Kuraishi; Shigetoyo Kogaki; Mitsuhiro Nishimura; Mamoru Ayusawa; Fukiko Ichida; Hirokuni Yamazawa; Rumiko Matsuoka; Shigeaki Nonoyama; Toshio Nakanishi. Prognostic predictive value of gene mutations in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart and Vessels* 2017 Jun;32(6):700-707. doi: 10.1007/s00380-016-0920-0.
 - 12) Masaya Aoki, Keiichi Hirono, Tomonori Higuma, Yoko Suzuki, Kazuhiko Nakayama, PhD, Akio Yamashita, Kazuaki Fukahara, Fukiko Ichida, Noriaki Emoto, Naoki Yoshimura. Pulmonary vascular disease in a failed Fontan patient with Down's syndrome *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2017 Aug 10. doi: 10.1007/s11748-017-0809-6. [Epub ahead of print] PMID: 28799131
- 〔学会発表〕(計 25件)
1. 会長要望演題「小児心筋疾患と不整脈」廣野恵一、宮尾成明、岡部真子、齋藤和由、小澤綾佳、市田蒨子、畑由紀子、西田尚樹 第22回日本小児心電学会学術集会、2017年11月24日、徳島
 2. A novel MYH7 and CD36 gene variants in a fetus with left ventricular noncompaction; crosstalk between beta myosin heavy chain and fatty acid translocase deteriorates heart failure after surgical intervention 廣野 恵一、酒井武彦、小澤綾佳、畑由紀子、西田直徳、岡部真子、宮尾成明、齋藤和由、芳村直樹、西田尚樹、市田蒨子 日本人類遺伝学会第62回大会、2017年11月16日、神戸
 3. MYH7 遺伝子変異と CD36 遺伝子変異が見いだされた心筋緻密化障害の一例 廣野 恵一、酒井武彦、小澤綾佳、畑由紀子、西田直徳、岡部真子、宮尾成明、齋藤和由、芳村直樹、西田尚樹、市田蒨子

- 子 2017 年度第 26 回日本小児心筋疾患学会、2017 年 10 月 14 日、倉敷
4. 第14回教育セミナー:Basic course、B ここまで知っておきたい心筋症:「1.解剖から分子医学まで」廣野 恵一 2017 年度日本小児循環器学会、2017 年 7 月 9 日、浜松
 5. Phenotype-Genotype correlations in the fetal patients with left ventricular noncompaction Keiichi Hirono, Yukiko Hata, Sayaka Ozawa, Ce Wang, Takako Toda, Nobuo Momoi, Ryo Inuzuka, Nagamine Hiroki, Heima Sakaguchi, Kenichi Kurosaki, Mako Okabe, Naruaki Miyao, Hedeyuki Nakaoka, Keijirou Ibuki, Kazuyoshi Saito, Naoki Nishida, Fukiko Ichida The 13th Japan-China-Korea Pediatric Heart Forum with Asian Pacific Symposium、2017年7月9日、浜松
 6. 市田 落子 分野別シンポジウム 国際的な小児循環器研究を学ぶ午後「心筋緻密化障害の分子遺伝医学」第120回日本小児科学会 2017.4.14、東京
 7. Fukiko Ichida: Invited Lecture The Zebras in Pediatric Cardiology. A National Registry of Rare Cardiac Disease in Children. The 51th Annual Meeting of AEPC, Mar 30, 2017 Lyon
 8. 「ガイドライン解説 3」2014-2015 年度活動 学校心臓検診のガイドライン、4. 心筋症・心筋炎の管理 廣野 恵一、市田 落子 第 81 回日本循環器学会学術集会、2017 年 3 月 18 日、金沢
 9. 会長特別企画 2「循環器領域難治性稀少疾患の克服にむけて」Left Ventricular Non-compaction 廣野 恵一 第81回日本循環器学会学術集会、2017年3月17日、金沢
 10. 市田 落子: 特別講演 心筋緻密化障害の臨床～症例報告から遺伝子解析まで20年間の研究から見たもの～第319回日本小児科学会北陸地方会、2017.3.12富山
- 〔図書〕(計 21 件)
- 1) 市田 落子. 今日の治療指針-2017 年版. 山口徹, 北原光男編. 東京: 医学書院; 2017. 心疾患をもつ乳幼児の日常生活の管理と指導. p 1360 - 61 .
 - 2) 市田 落子. 今日の治療指針-2017 年版. 山口徹, 北原光男編. 東京: 医学書院; 2017. 心疾患患者の妊娠・出産の適応・管理. p 429
 - 3) 廣野 恵一、市田 落子 川崎病の病因研究 概論 海外の研究から 日本川崎病学会病因検討小委員会編 日本川崎病学会事務局 2017;44-49
 - 4) 小澤 綾佳、市田 落子 妊娠・分娩時の血行動態を含む母体の変化 Heart View 2017 ; 21 : 26-30

- 5) Keiichi Hirono, Fukiko Ichida 『Kawasaki Disease: Current Understanding of Mechanism and Evidence-based Treatment』 Evidences of endothelial damage in acute stage. Saji, B.T., Newburger, J.W., Burns, J.C., Takahashi, M. (Eds.), 2016: 335-340. Springer, Japan
- 6) 小澤 綾佳、市田 落子: 心筋緻密化障害 竹中 克編『心エコーハンドブック 心不全』 金芳堂, 京都 2016;219-226
- 7) 廣野 恵一、市田 落子: 『診断モダリティとしての心筋病理: 心筋緻密化障害』 和泉徹・廣江道昭編 南江堂 東京、2016: 136 ~ 138
- 8) 西田 直樹、市田 落子: 『診断モダリティとしての心筋病理: ダノン病』 和泉徹・廣江道昭編 南江堂 東京、2016: 168 ~ 171

〔産業財産権〕
なし
〔その他〕
ホームページ等 なし

6 . 研究組織

- (1)研究代表者
市田 落子 (ICHIDA, Fukiko)
富山大学・学長補佐
研究者番号 : 30223100
- (2)研究分担者
西田 尚樹 (NISHIDA, Naoki)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・教授
研究者番号 : 10315088
- (3)研究分担者
畑 由紀子 (HATA, Yukiko)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・准教授
研究者番号 : 30311674
- (4) 研究分担者
小澤 綾佳 (OZAWA, Ayaka)
富山大学・附属病院・診療助手
研究者番号 : 40596540
- (5) 研究分担者
廣野 恵一 (HIRONO, Keiichi)
富山大学・附属病院・助教
研究者番号 : 80456384