

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08540

研究課題名(和文) 拡張型心筋症における脳セロトニン合成律速酵素Tph2遺伝子機能的多型の役割

研究課題名(英文) Role of a functional SNP of the gene coding brain serotonin synthesis rate-limiting enzyme Tph2 in dilated cardiomyopathy

研究代表者

森本 幸生 (Morimoto, Sachio)

国際医療福祉大学・福岡保健医療学部・教授

研究者番号：50202362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：トリプトファンヒドロキシラーゼ2(Tph2)は脳のセロトニン合成の律速酵素である。近交系マウスTph2には高活性型G/Gアレルと低活性型C/Cアレルがある。本研究では拡張型心筋症(DCM)ノックインマウスにおいてこのSNPを入れ替えたB6系統とBALB/c系統のコンジェニックマウスを作製しDCM疾患表現型における役割を検討した。C/CアレルをもつDCMマウスは系統によらず心臓突然死を頻繁に発生するのに対して、G/GアレルをもつDCMマウスは系統によらずうっ血性心不全死を頻繁に発生した。これらの結果は脳セロトニン機能がDCMの疾患の表現型に重要な役割を果たすことを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「脳セロトニン機能がDCM疾患表現型に影響する可能性がある」というのは以前の薬理学的研究(Li et al. J Mol Cell Cardiol, 2012)から導いた我々独自の仮説である。本研究は、近交系マウスに存在する活性の異なるセロトニン合成律速酵素Tph2の遺伝子多型を利用してこの仮説をさらに支持する新たな科学的証拠を提供するものである。本研究の成果は心不全および心臓突然死の精神的な面からの予防法開発や心理的ストレスが心疾患を誘発するメカニズムの解明などに役立つものであると期待される。

研究成果の概要(英文)：Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) expressed specifically in the central nervous system is involved in serotonin synthesis in the brain as a rate-limiting enzyme. Inbred mice have a functional SNP C1473G in Tph2, with the activity being lower in BALB/c with G/G allele than in C57BL/6 with C/C allele. In this study, we examined the role of this SNP in the disease phenotype of knock-in mice with a dilated cardiomyopathy (DCM)-causing mutation deltaK210 in cTnT by creating single-gene congenic strain with Tph2 1473C/C or G/G allele. C57BL/6 DCM mice frequently suffered from sudden cardiac death (SCD) with no heart failure symptoms, whereas BALB/c DCM mice mostly died of congestive HF. Introduction of G/G allele into C57BL/6 DCM mice caused congestive HF death and extended the life expectancy. On the other hand, introduction of C/C allele into BALB/c DCM mice caused SCD. Present results suggest that brain serotonin function plays an important role in the disease phenotype of DCM.

研究分野：心臓生理学

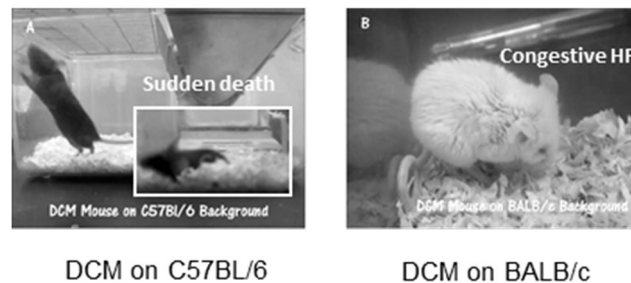
キーワード：遺伝性拡張型心筋症 ノックインマウス 脳セロトニン機能 心臓突然死 心不全死

## 1. 研究開始当初の背景

心室内腔拡張と収縮機能障害を特徴とする DCM は重篤なうっ血性心不全と心臓突然死の原因となる心筋疾患である。長い間不明であった DCM の原因としてジストロフィンや心筋トロポニン T をはじめとする心筋細胞を構成する蛋白質の遺伝子突然変異が 20 年ほど前から報告されるようになり、現在では DCM 症例の約 30% がなんらかの心筋細胞蛋白質の遺伝子突然変異が原因であることがわかっている。

我々はこの難治性かつ致死性の疾患に対する治療薬を見出すことを最終的な目的にして、これまで論文上において 10 家系以上が報告されている心筋トロポニン T 遺伝子の 1 アミノ酸欠失突然変異  $\Delta K210$  を導入したノックインマウスを作製し、その分子病態発生メカニズムの解明を試みてきた (Du et al. *Circ Res* 2007)。この C57BL/6 の遺伝的背景をもつノックインマウスはヒトと同様に著明な心拡大と心収縮機能障害を示すが、高頻度の突然死を発生するにもかかわらず呼吸困難や自発運動の低下などの明らかな心不全症状を示さないことから、機能的に代償した心肥大を形成しているものと考えられる。同じ遺伝子変異をもつヒト DCM 患者では重篤な心不全を発症し死亡する例も多く報告されており、このようなヒト患者の臨床表現型との違いは疾患モデル動物として大きな問題であった。しかし、その後このノックインマウスの遺伝的背景を 10 世代以上の戻し交配によって BALB/c に変更することによって、突然死しない代わりに進行性のうっ血性心不全を発症して衰弱死する DCM モデルマウスを開発することに成功した (Fig.1 : Li et al. *J Mol Cell Cardiol*, 2012)。ヒトにおいても突然死が多い家系と心不全死が多い家系が報告されており、単一遺伝子疾患とされてい

Fig. 1 cTnT $\Delta K210$  DCM knockin mice



てもその他の遺伝的要因によって疾患表現型が変化する可能性を示唆している。

心不全患者のうつ病罹患率は約 22% と一般の集団に比べて 2-3 倍高く、うつ病は死亡および関連する臨床的イベントの発生リスクを 2 倍以上高めることが証明されている (*J Am Coll Cardiol* 2006;48:1527-1537)。うつ病には脳におけるセロトニン (5-HT) 神経伝達の欠陥が関与していると考えられているが、うつ病患者では中枢神経における 5-HT 合成酵素であるトリプトファン水酸化酵素 2 (tryptophan hydroxylase-2, TPH2) の酵素活性が約 80% 低下する TPH2 遺伝子の機能的一塩基多型 (SNP) G1463A が有意に高い頻度で同定されている (*Neuron* 2005;45:11-16)。

面白いことに、近交系マウスの *Tph2* 遺伝子においてもその近くに酵素活性を約 55% 低下させる機能的多型 C1473G が見つかっている (Fig.2 : *Science* 2004;305:217)。

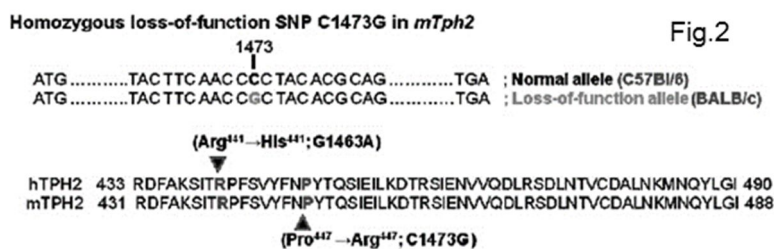


Fig.2

いことに、C57BL/6 系統は正常機能型 SNP 1473C をホモ接合体で持つのに対して、うつ病関連行動を強く示す BALB/c 系統 (*Nat Rev Drug Discov* 2005;4:775-790) は機能低

下型 SNP 1473G をホモ接合体で持っている。そこで、我々は以前の研究で BALB/c 遺伝的背景 DCM ノックインマウスに選択的セロトニン取り込み阻害薬 (SSRI) パロキセチンあるいは 5-HT<sub>1A</sub> 受容体パーシャルアゴニストである抗不安薬ブスピロンを投与したところ、心不全の発症が有意に抑えられたことから、*Tph2* 遺伝子の機能低下 SNP による脳セロトニン機能障害が心不全の発症に関与している可能性を提唱した (Li et al. *J Mol Cell Cardiol*, 2012)。しかし、この薬理学的研究から導かれた結論はいまだ仮説であり、*Tph2* 遺伝子多型が C57BL/6 と BALB/c 遺伝的背景の DCM ノックインマウスの疾患表現型の違いに影響を与えていることを直接証明する必要がある。そこで、本研究では C57BL/6 と BALB/c 系統の遺伝的背景上で *Tph2* 遺伝子多型のみを入れ替えたコンジェニックマウスを作製し解析することによって、この 2 つの系統間でみられる心臓突然死と心不全死という明らかに異なる

DCM 疾患表現型において *Tph2* 遺伝子の機能的多型が果たしている役割を検証した。

## 2. 研究の目的

拡張型心筋症 (DCM) を引き起こす心筋トロポニン T 遺伝子突然変異 ( $\Delta K210$ ) を導入した 2 系統の遺伝的背景 (BALB/c と C57BL/6) のノックインマウスにおいて、C57BL/6 系統は心不全を発症せず不整脈により突然死するが、BALB/c 系統は重篤なうっ血性心不全を発症し衰弱死する。心不全患者ではうつ病罹患率が高いことが知られているが、興味深いことに BALB/c マウスは脳セロトニン合成律速酵素であるトリプトファン水酸化酵素 2 の遺伝子 (*Tph2*) の一塩基多型により脳セロトニンレベルが低下している。本研究では BALB/c と C57BL/6 の 2 系統の DCM ノックインマウス間で *Tph2* 多型のみを入れ替えたコンジェニックマウスを作製し解析することによって、DCM 疾患表現型における脳セロトニン機能の役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 1. C57BL/6 系統と BALB/c 系統マウス間で *Tph2* 遺伝子多型のみを入れ替えた心筋トロポニン T $\Delta K210$ ホモ接合体 DCM コンジェニックマウスの作製

野生型 C57BL/6 系統 (*Tph2* 1473C/C) と BALB/c 系統 (*Tph2* 1473G/G) マウスをそれぞれ BALB/c 系統と C57BL/6 系統に戻し交配した。この際に *Tph2* 遺伝子 1473C と 1473G アレルをヘテロ接合体 (1473C/G) でもつ産仔を ARMS-PCR によって選別し、その中から全染色体に約 20cM 間隔で設定した 80 個のマイクロサテライトマーカーのマルチプレックス PCR 解析によって最もホモ置換率の高い個体を選択し次の戻し交配に使用した。これを 6 世代繰り返しホモ置換率 79/80 の *Tph2* 1473C/G を持つ C57BL/6 と BALB/c 系統コンジェニックマウスを作出した (スピードコンジェニック法)。次にレシピエント系統と同じ遺伝的背景を持つ  $\Delta K210$  ヘテロ接合体 DCM マウスと交配することによって *Tph2* 1473C/G を持つ  $\Delta K210$  ヘテロ接合体 DCM コンジェニックマウスを作出した。さらに兄弟交配によって *Tph2* 1473C/C を持つ BALB/c 背景  $\Delta K210$  ヘテロ接合体 DCM コンジェニックマウスと *Tph2* 1473G/G を持つ C57BL/6 背景  $\Delta K210$  ヘテロ接合体 DCM コンジェニックマウスを作出した。本研究では最終的にこのヘテロ接合体 DCM マウスの兄弟交配を行い、C57BL/6 と BALB/c 遺伝的背景上に *Tph2* 1473C/G, C/C および G/G アレルをもつ  $\Delta K210$  ホモ接合体 DCM コンジェニックマウス (6 系統) を作出した。

### 2. DCM 疾患表現型の解析

上記の交配によって順次得られた  $\Delta K210$  ホモ接合体 DCM コンジェニックマウス (*Tph2* 1473C/G, C/C or G/G) の疾患表現型を下記のようなさまざまなレベルで解析した。

ジェノタイプングを 3 週齢で行い 4 週齢以降の生命予後を調べた。本研究で用いる心筋トロポニン T  $\Delta K210$  ホモ接合体 DCM マウスの BALB/c 系統は心不全、C57BL/6 系統は心臓突然死により半年以内にほぼすべてが死亡することがわかっている。本研究では心臓突然死であるのか心不全による衰弱死であるのか判別するため、死亡するまで毎日観察を行い、体重・体温 (直腸温) を 2 週間おきに計測し、大きな変化が見られたあとは毎日計測した。死亡時の心臓リモデリングと肺うっ血レベルを比較するため、体重、脛骨長とともに心重量、肺重量を計測した。さらに、4 週令以降、2 週間ごとに M モード心エコー計測を行い左室駆出率、拡張末期左室内径等を計測した。

### 4. 研究成果

4 週齢以降の生命予後、心臓リモデリング、肺うっ血の程度および心機能を調べた結果、低活性型 G/G 多型はどちらの系統においても高活性型 C/C 多型より高度な心臓リモデリングと肺うっ血をもたらす心不全を誘発するのに対して、高活性型 C/C 多型は明らかな心不全を誘発せず、そのかわり心臓突然死を高い頻度で誘発することが明らかになった。また、どちらの系統においても低活性型多型は高活性型多型に比べて生命予後を有意に延長した。C57BL/6 系統 DCM マウスに低活性型 G/G 多型を導入した場合、約半数に体重減少・呼吸困難・毛並み悪化・運動活性の極端な低下など本来高活性型 C/C 多型を持つ C57BL/6 系統 DCM マウスでは全く見られない重症心不全様症状が観察された。低活性型 G/G 多型を持つ本来の BALB/c 系統 DCM マウスではこのような重症心不全様症状が 100% 観察されることから、*Tph2* 多型が C57BL/6 と BALB/c 系統間で見られる疾患表現型の違いに大きな影響を与えていることは明らかではあるが、さらに未知の遺伝的多型も関与している可能性が強く示唆された。最終年度は個体数を飛躍的に増やすことができたおかげで拡張型心筋症疾患表現型の違いにおける *Tph2* 多型の役割がかなりはっきりと見えてきた。しかしながら、BALB/c 系統に高活性型 *Tph2* 多型を導入したマウスの解析個体数は依然として 6 例と極端に少ないため、今後も引き続き本研究課題を継続し確認する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ikeda Soichiro, Matsushima Shouji, Okabe Kosuke, Ikeda Masataka, Ishikita Akihito, Tadokoro Tomonori, Enzan Nobuyuki, Yamamoto Taishi, Sada Masashi, Deguchi Hiroko, Morimoto Sachio, Ide Tomomi, Tsutsui Hiroyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Blockade of L-type Ca <sup>2+</sup> channel attenuates doxorubicin-induced cardiomyopathy via suppression of CaMKII-NF- $\kappa$ B pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9850
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46367-6	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 -

1. 著者名 Arimura Takuro, Muchir Antoine, Kuwahara Masayoshi, Morimoto Sachio, Ishikawa Taisuke, Du Cheng-Kun, Zhan Dong-Yun, Nakao Shu, Machida Noboru, Tanaka Ryo, Yamane Yoshihisa, Hayashi Takeharu, Kimura Akinori	4. 巻 314
2. 論文標題 Overexpression of heart-specific small subunit of myosin light chain phosphatase results in heart failure and conduction disturbance	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology	6. 最初と最後の頁 H1192 ~ H1202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpheart.00696.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hayamizu Kengo, Morimoto Sachio, Nonaka Miki, Hoka Sumio, Sasaguri Toshiyuki	4. 巻 637
2. 論文標題 Cardiotonic actions of quercetin and its metabolite tamarixetin through a digitalis-like enhancement of Ca <sup>2+</sup> transients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 40 ~ 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2017.11.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okuda Shinichi, Sufu-Shimizu Yoko, Kato Takayoshi, Fukuda Masakazu, Nishimura Shigehiko, Oda Tetsuro, Kobayashi Shigeki, Yamamoto Takeshi, Morimoto Sachio, Yano Masafumi	4. 巻 496
2. 論文標題 CaMKII-mediated phosphorylation of RyR2 plays a crucial role in aberrant Ca <sup>2+</sup> release as an arrhythmogenic substrate in cardiac troponin T-related familial hypertrophic cardiomyopathy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1250 ~ 1256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.01.181	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishizu Takamaru, Higo Shuichiro, Masumura Yuki, Kohama Yasuaki, Shiba Mikio, Higo Tomoaki, Shibamoto Masato, Nakagawa Akito, Morimoto Sachio, Takashima Seiji, Hikoso Shungo, Sakata Yasushi	4. 巻 7
2. 論文標題 Targeted Genome Replacement via Homology-directed Repair in Non-dividing Cardiomyocytes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-09716-x	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 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Sachio Morimoto, Kengo Hayamizu, Miki Nonaka, Lei Li, Yuanyuan Wang
2. 発表標題 Role of a Functional SNP of the Gene Coding Brain Serotonin Synthesis Rate-Limiting Enzyme Tph2 in Dilated Cardiomyopathy
3. 学会等名 Biophysical Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nagomi Kurebayashi, Takashi Murayama, Masato Konishi, Shuichi Mori, Mari Ishigami-Yuasa, Hiroyuki Kagechika, Haruo Ogawa, Sachio Morimoto
2. 発表標題 Effects of RyR2 Inhibitors on Ca <sup>2+</sup> Signals in Healthy and Diseased Cardiac Cells
3. 学会等名 Biophysical Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 拡張型心筋症モデルマウスにおける性差による自発運動の効果の違い
2. 発表標題 杉原 匡美, 柿木 亮, 村山 尚, 三井田 孝, 櫻井 隆, 森本 幸生, 呉林 なごみ
3. 学会等名 日本薬理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森本 幸生, 早水 恵吾
2. 発表標題 拡張型心筋症における脳セロトニン合成律速酵素Tph2遺伝子機能的多型の役割
3. 学会等名 日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杜 成坤, 戦 冬雲, 森本 幸生, 秋山 剛, 白井 幹康, Pearson James
2. 発表標題 遺伝性肥大型心筋症ノックインマウスモデルの出生後早期の病態
3. 学会等名 日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森本 幸生
2. 発表標題 ミオフィラメントCa感受性と遺伝性心筋症
3. 学会等名 CVMW2018心血管代謝週間(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 南沢 享、谷端 淳、藤本 義隆、森本 幸生
2. 発表標題 若年性拡張型心筋症の初期 進行因子にカテコラミンは関 わるか? -DCMモデルマウスによる検 討-
3. 学会等名 日本心不全学会第4回日本心筋症研究会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杜 成坤、戦 冬雲、森本 幸生、秋山 剛、白井 幹康、Pearson James
2. 発表標題 ヒト拡張型心筋症ノックインマウスモデルの出生後早期における心機能評価
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉原 匡美、柿木 亮、村山 尚、三井田 孝、櫻井 隆、森本 幸生、呉林 なごみ
2. 発表標題 毎日の自発運動は拡張型心筋症モデルマウスにおける心不全進行を抑制する
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masami Sugihara, Ryo Kakig, Takashi Murayama, Takashi Miida, Takashi Sakurai, Sachio Morimoto, Nagomi Kurebayashi
2. 発表標題 The Effects of Frequency of Voluntary Exercise on Cardiac Function in Dilated Cardiomyopathy Model Mice
3. 学会等名 2019 Biophysical Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nagomi Kurebayashi, Murayama, Mai Tamura, Shuichi Mori, Mari Yuasa-Ishigami, Hiroyuki Kagechika, Junji Suzuki, Kazunori Kanemaru, Masamitsu Iino, Sachio Morimoto, Takashi Sakurai,
2. 発表標題 Effects of Novel RyR2 Inhibitors on Diseased Hearts
3. 学会等名 2019 Biophysical Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sugihara M, Kakigi R, Murayama T, Miida T, . Sakura T, Morimoto S, Kurebayash N
2. 発表標題 Relation between Voluntary Exercise Frequency and Cardiac Function in Dilated Cardiomyopathy Model Mice
3. 学会等名 2nd Annual Meeting of the Biophysical Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hayamizu K, Nonaka M, Morimoto S
2. 発表標題 Cardiotonic actions of quercetin and its metabolite tamarixetin through a digitalis-like enhancement of Ca <sup>2+</sup> transients
3. 学会等名 2nd Annual Meeting of the Biophysical Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 杜 成坤、森本 幸生	4. 発行年 2018年
2. 出版社 日本臨牀社	5. 総ページ数 715
3. 書名 心不全：最新の基礎・臨床研究の進歩	

〔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
---------------------------	-----------------------	----