

平成 22 年 5 月 7 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790520
 研究課題名（和文）ゲノム医科学的アプローチによる特発性心筋症病態形成メカニズムの解明
 研究課題名（英文）Molecular pathogenetic mechanism of idiopathic cardiomyopathy
 研究代表者
 有村 卓朗（ARIMURA TAKURO）
 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教
 研究者番号：50342887

研究成果の概要（和文）：

特発性心筋症は難治性心不全を来たす心筋原発性疾患である。本研究では、特発性心筋症の新規病態形成メカニズムの解明を目的として、非心筋収縮調節要素異常と特発性心筋症との関わりについて解析を行い、その結果として(1) 新規拡張型心筋症原因遺伝子として CARP (*ANKRD1*) およびフクチン (*FKTN*) を同定し、(2) ZASP/Cypher 内の拡張型心筋症病因変異による PGM1 タンパクの細胞内動態変化がその病態と深く関わっていることを解明した。

研究成果の概要（英文）：

Idiopathic cardiomyopathy (ICM) is heterogeneous myocardial disease associated with functional abnormalities of cardiomyocytes. The aim of this study was to investigate the novel molecular pathogenesis of ICM caused by the genetic abnormalities. As the results, it was identified that (1) mutations in genes encoding CARP and Fukutin are associated with dilated cardiomyopathy (DCM), and (2) ZASP/Cypher anchors PGM1 to Z-disc under conditions of stress and the impaired binding of PGM1 to ZASP/Cypher might be involved in the pathogenesis of DCM.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：人類遺伝学

科研費の分科・細目：7203

キーワード：特発性心筋症、肥大型心筋症、拡張型心筋症、遺伝子変異、CARP、フクチン、PGM1、ZASP/Cypher

1. 研究開始当初の背景

心不全は心機能低下により身体活動に必

要な血液を全身に送れなくなった病態であり、QOL を著しく低下させ、多臓器不全や不

整脈による突然死をもたらすことから、その病態メカニズムに即した効果的な治療法の確立が求められている。心不全の原因としては、多種多様な心筋への外的、内的ストレスが挙げられるが、外的ストレスとしては、高血圧、心筋虚血、弁膜症、糖尿病等の代謝異常、ウイルス感染等がある。一方、内的ストレスの本態は遺伝子とその機能変化に起因するものである。これまでの研究により、心不全の発症や病態形成には機能が未知な遺伝子を含む多種多様な遺伝子群(心不全関連遺伝子群)が関与していることが明らかにされつつあるが、心不全関連遺伝子群の全貌は不明であり、個々の遺伝子の機能変化や相互関連さらには病態形成への寄与度についても不明な点が多い。また内的ストレスによる心不全の発症や進展に、外的ストレスが修飾因子として関与することも知られているが、そのメカニズムについても未だ不明である。

内的ストレス、つまり遺伝的要因の関与が特に大きな心不全病態である特発性心筋症には種々の臨床病型があり、肥大型心筋症(HCM, 心筋肥大と心腔拡張障害を主徴とする)ならびに拡張型心筋症(DCM, 心室腔の拡張とそれに伴う心室筋収縮障害を主徴とする)が主体である。最近10数年間における分子遺伝学的解析の進展によりそれらの原因遺伝子が次々と判明しつつあるが、申請者らはその中でも中心的な役割を果たしており、最近4年間だけでも、新規の特発性心筋症原因遺伝子を6種(*CAV3*, *ZASP/Cypher*, *TCAP*, *CRYAB*, *FHL2*, *OBSCN*)世界に先駆けて報告してきた。それらを含めてそれぞれ20種類以上同定されているHCMおよびDCM原因遺伝子は主に心筋収縮力を惹起する最小単位である心筋サルコメア、もしくはそれらの収縮力を隣接するサルコメアへ伝達する為の足場となるZ帯構成要素をコードするものである。しかしながら、近年申請者らが特発性心筋症原因変異を見出した遺伝子によってコードされる蛋白のうち、心筋Z帯および隣接するI帯に存在する*ZASP/Cypher*、 α -クリスタリン、*FHL2*、オブスクリンなどはPKC、エネルギー代謝酵素、 Ca^{2+} /カルモデュリンやGタンパク質等との結合能を持つが、病変変異によってそれらの結合能に異常を来たすことが変異蛋白の機能解析により明らかとなった。このことから申請者らは、心筋サルコメア/Z帯構成要素変異は収縮力制御とその伝達の異常という物理的な障害のみならず、各種シグナル伝達系蛋白の心筋Z/I帯への局在異常とそれによってもたらされる機能異常が心筋症病態発症へ関与するとの仮説を近年提唱している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、前述のように心筋症の病

態形成メカニズムの解明を心筋収縮制御異常以外の観点から行うことであるが、最終的な到達目標は、生命活動において最も重要な器官である心臓の疾患(心不全)について、これまでに知られていない発症メカニズムについての理解を深め、様々な病因から心不全へと導く common pathway を同定することで最終的な新規治療法開発へ繋げる事である。

心臓は生体機能維持に必要な酸素を全身に供給する為のポンプとして、収縮と拡張を交互に繰り返し拍動する臓器であり、その最小収縮単位であるサルコメアはZ/I帯を介して隣のサルコメアと接続することで心筋線維を構成している。さらに心筋サルコメアおよびZ/I帯にはアクチンやミオシンに代表される心筋収縮調節タンパクが豊富に存在し、それらの分子が相互に機能連関することによって収縮機能の維持が為されている。これら心筋構造維持や収縮力の調節を行うタンパクの機能障害が心機能変化→心不全をもたらす事は想像に難しくなく、事実、これまでの申請者らの解析からもこのことは明らかである。一方、心筋収縮に対する直接的な機能を保持しない多数のタンパク群が特にZ/I帯に存在し、それらの機能変化が心不全と関連することが申請者らを含めた最近の研究から明らかとなりつつある。しかしながら、それらの局在の意義、さらにそれらの分子が心筋収縮にいかなる影響を与え最終的に心筋症病態を形成するかについては全く不明である。

将来的な心筋症病態の common pathway の理解へ向けた今後の課題として、心筋Z/I帯に局在する非収縮調節タンパク異常の解明と、それらの異常による機能変化を明らかにすることは心不全をもたらすメカニズムの全貌の解明のために必須である。そこで本研究では分子遺伝学および生化学的手法を用いて以下の実験を行った。

3. 研究の方法

(1) 遺伝性心不全の病因ゲノムとその病態形成機構の解明

①心筋Z/I帯に局在する非収縮調節タンパクをコードする遺伝子群について、既知の原因遺伝子に変異の同定されていない肥大型心筋症患者集団(家族例100、孤発例140)および拡張型心筋症患者集団(家族例40、孤発例100)を対象にダイレクトシーケンシング法を用いて変異検索を行う。

②上記①の解析において遺伝子変異が見出された場合は、正常および変異型についてMycおよびGFP融合タンパク発現ベクターを構築し、これを筋芽細胞C2C12細胞株や心筋H2C9細胞株に導入・発現させ、当該タンパクの細胞内局在変化、細胞形態変化やサルコメ

ア整合性変化について検討を行う。またベクター導入を行った各細胞株については、ストレッチャブルプレート上で培養を行うことで持続的な進展刺激を加えた後、ストレッチ反応性タンパクをコードする遺伝子群について発現解析を行う。

③酵母2ハイブリッド法を用いて、変異が見出された遺伝子によってコードされるタンパクと結合能を持つ分子のスクリーニングを行い、標的タンパクを同定する。さらに、見出された変異によってそれらの標的分子との結合力が変化するか否かについて哺乳類細胞2ハイブリッド法や免疫沈降 pull-down 法を用いた検討を行う。

(2) 心筋 Z/I 帯に局在する非収縮タンパクの存在意義と、その機能異常による心筋症発症メカニズム

①酵母2ハイブリッド法を用いて、その心筋特異的ドメイン内変異が拡張型心筋症を引き起こすことが明らかとなっている ZASP/Cypher タンパクと結合能を持つ分子のスクリーニングを行い、新規結合タンパクの単離を行う。次いで、ZASP/Cypher の各ドメイン内に存在するモチーフ配列について単離した結合タンパクとの結合能の解析を行うことで、詳細な結合モチーフを特定する。さらに ZASP/Cypher 内の結合ドメインに存在する拡張型心筋症原因変異による結合能に対する影響について、2ハイブリッド法や免疫沈降 pull-down 法を用いた検討を行う。

②ZASP/Cypher 結合性新規タンパクの心筋内での機能を明らかにするために、新生児ラット心筋細胞内への発現を行い、さらにそれらの遺伝子導入細胞に対してストレッチ刺激や各種細胞ストレスを加えることで、これらのタンパクの心筋細胞内における局在や、各種刺激による細胞内動態変化を検討する。

4. 研究成果

(1) 遺伝性心不全の病因ゲノムとその病態形成機構の解明

①前年度までに肥大型心筋症原因遺伝子として同定した CARP 遺伝子 (*ANKRD1*) 内における変異について拡張型心筋症患者集団において検索を行い、Pro105Ser、Val107Leu および Met184Ile の計3種類の新規点変異を4名の患者に同定した。これらの拡張型心筋症における CARP 遺伝子変異は、肥大型心筋症原因変異の場合とは異なり、骨格筋由来 C2C12 細胞および心筋由来 H9C2 細胞において細胞内局在異常を示さなかったが、Talin-1 や FHL2 といった細胞骨格成分と CARP との結合性の減少を引き起こした。また変異存在下におけるメカニカルストレッチ反応に対する各遺伝子群の発現解析を行った結果、細胞周期やアポトーシス、サイトカインやカルシウムシグナル関連遺伝子の発現パターンが細胞への進展刺激によって変化し

ていた。これらの結果から、CARP 遺伝子変異は心筋 Z/I 帯における心筋ストレッチ反応性シグナル伝達の異常によって拡張型心筋症病態をもたらすことが明らかとなった。

②以前よりフクチンタンパクをコードする *FKTN* 遺伝子変異が、精神遅滞と全身の筋力低下を主徴とする福山型筋ジストロフィーの原因となることは知られていたが、最近軽度の筋力低下を伴う拡張型心筋症患者においてもこの遺伝子変異が原因となることが示され、*FKTN* 変異を原因とする横紋筋疾患の多様性が示唆されている。そこで、肥大型心筋症および拡張型心筋症患者集団において *FKTN* 遺伝子内の変異検索を行った結果、高 CK 血症を合併する1名の拡張型心筋症患者に 3kb の挿入および Cys101Phe の複合ヘテロ変異を同定した。一方、高 CK 血症などの骨格筋疾患の兆候を持たない特発性心筋症患者には *FKTN* 変異は見出されなかった。以上の結果より、*FKTN* 遺伝子における複合ヘテロ変異は非常に稀な拡張型心筋症の原因であるが、高 CK 血症を併発する拡張型心筋症患者においては *FKTN* 変異検索が臨床診断の一助となることが示された。

(2) 心筋 Z/I 帯に局在する非収縮タンパクの存在意義と、その機能異常による心筋症発症メカニズム

これまでに拡張型心筋症の原因遺伝子として同定した *LDB3* 遺伝子によってコードされる ZASP/Cypher タンパク内の心筋特異的ドメインに結合する新規タンパクのスクリーニングを酵母2ハイブリッド法を用いて行い、糖代謝酵素として知られている Phosphoglucomutase1 (PGM1) を同定した。さらに、PGM1 と ZASP/Cypher タンパク間の結合ドメインについて詳細な検討を行い、PGM1 の C 末端側 80 アミノ酸は *LDB3* 遺伝子のエクソン 4、6 および 10 によってコードされるプロリンリッチモチーフや ZASP 様モチーフとの結合を示すことや、それらの結合性は、エクソン 4 および 10 内に存在する拡張型心筋症の病因変異である Ser189Leu、Thr206Ile や Ile345Met の存在下において有意に減少することを明らかにした。一方、PGM1 の心筋内における機能を明らかにする為に、まず新生児ラット心筋細胞を単離し、その細胞内で GFP-PGM1 を発現させて心筋細胞内における局在の検討を行ったところ、通常培養条件下では細胞質内に拡散している PGM1 が低栄養ストレス条件下（無血清培地や無グルコース培地）においては心筋 Z 帯への局在を示すことが明らかとなった（図1参照）。

さらにこれらの低栄養ストレス状態に依存した局在変化は PGM1 の C 末端側 ZASP/Cypher 結合ドメインのみでも同様に観察された。以上のことから、PGM1 は細胞への

ストレス条件下において ZASP/Cypher を足場として心筋 Z 帯への局在を示すが、遺伝子変異による PGM1-ZASP/Cypher 結合の低下が PGM1 の局在変化に影響を及ぼし、これらのことが拡張型心筋症の発症に関与することが示唆された。

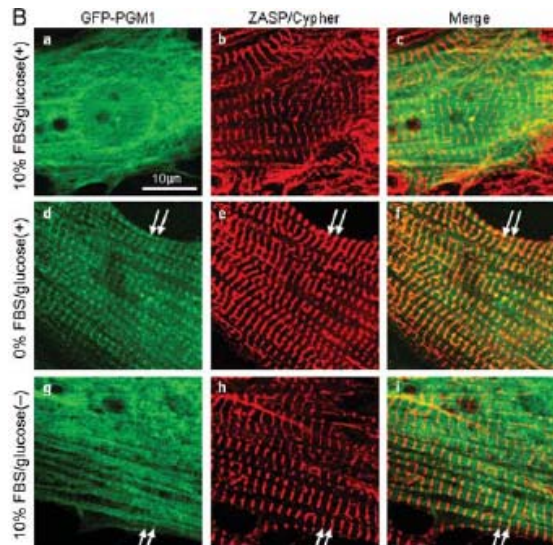


図 1 : 新生児ラット心筋細胞内における GFP 融合 PGM1 の局在

(a-c) 通常培地、(d-f) 無血清培地、(g-i) 無グルコース培地によってそれぞれ 72 時間培養。a, d, および g は GFP-PGM1 局在を、b, e, および h は ZASP/Cypher 局在 (Z 帯) を示している。通常培地下では細胞質内へ拡散しており、ZASP/Cypher と異なった分布を示す GFP-PGM1 がストレス条件下では ZASP/Cypher と共局在 (矢印) している。

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 9 件)

- 1) Matuda S, Arimura T, Kimura A, Takekura H, Ohta S, Nakano K: A novel protein found in the I bands of myofibrils is produced by alternative splicing of the DLST gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1800(1):31-9, 2010.
- 2) Sato A, Arimura T, Makita N, Ishikawa T, Aizawa Y, Ushinohama H, Aizawa Y, Kimura A: Novel mechanisms of trafficking defect caused by KCNQ1 mutations found in long QT syndrome. *J. Biol. Chem.* 284(50):35122-33, 2009.
- 3) Hinohara K, Nakajima T, Yasunami M, Houda S, Sasaoka T, Yamamoto K, Lee BS, Shibata H, Takahashi TY, Arimura T, Sato A, Naruse T, Ban J, Inoko H, Yamada Y, Sawabe M, Park JE, Izumi T, Kimura A: Megakaryoblastic leukemia factor-1 gene

in the susceptibility to coronary artery disease. *Hum. Genet.* 126(4):539-47, 2009.

- 4) Park YE, Hayashi YK, Bonne G, Arimura T, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Autophagic degradation of nuclear components in mammalian cells. *Autophagy* 5(6):795-804, 2009.
- 5) Arimura T, Bos JM, Sato A, Kubo T, Okamoto H, Nishi H, Harada H, Koga Y, Moulik M, Doi YL, Towbin JA, Ackerman MJ, Kimura A: Cardiac ankyrin repeat protein gene (*ANKRD1*) mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 54(4):334-42, 2009.
- 6) Moulik M, Vatta M, Witt SH, Arola AM, Murphy RT, McKenna WJ, Borišek A, Oka K, Labeit S, Bowles NE, Arimura T, Kimura A, Towbin JA: *ANKRD1*, the gene encoding cardiac ankyrin repeat protein, is a novel dilated cardiomyopathy gene. *J. Am. Coll. Cardiol.* 54(4):325-33, 2009.
- 7) Arimura T, Inagaki N, Hayashi T, Shichi D, Sato A, Hinohara K, Vatta M, Towbin JA, Chikamori T, Yamashina A, Kimura A: Impaired binding of ZASP/Cypher with phosphoglucomutase 1 is associated with dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc. Res.* 83(1):80-8, 2009.
- 8) Arimura T, Hayashi YK, Murakami T, Oya Y, Funabe S, Arikawa EH, Hattori N, Nishino I, Kimura A: Mutational analysis of fukutin gene in dilated cardiomyopathy and hypertrophic cardiomyopathy. *Circ. J.* 73(1):158-61, 2009.
- 9) Hinohara K, Nakajima T, Takahashi M, Hohda S, Sasaoka T, Nakahara K, Chida K, Sawabe M, Arimura T, Sato A, Lee BS, Ban JM, Yasunami M, Park JE, Izumi T, Kimura A: Replication of the association between a chromosome 9p21 polymorphism and coronary artery disease in Japanese and Korean populations. *J. Hum. Genet.* 53(4):357-9, 2008.

[学会発表] (計 7 件)

- 1) Arimura T: Improvement of Left Ventricular Dysfunction and Survival Prognosis of Dilated Cardiomyopathy by Administration of a Novel Calcium Sensitizer in a Mouse Model. The 12th Cardiovascular Genomics and Atherosclerosis Symposium Satellite Meeting, Seoul, Korea, October 17, 2009.
- 2) 有村卓朗、木村彰方: テストステロンは

ラミン A/C 遺伝子変異 *Lmna*^{H222P/H222P} マウスにおける拡張型心筋症を増悪させる。第 54 回日本人類遺伝学会，東京，9 月 24 日，2009。

- 3) Arimura T: Identification of Novel Disease Genes for Hypertrophic Cardiomyopathy. The 8th Japanese-French Muscular Dystrophy Workshop “Physiopathology to Biotherapy”, Paris, France, July 3, 2009.
- 4) Arimura T, Bos JM, Sato A, Kubo T, Okamoto H, Nishi H, Harada H, Koga Y, Doi YL, Ackerman MJ, Kimura A: Identification of a novel gene for hypertrophic cardiomyopathy. The 73th Annual Meeting of the Japanese Circulation Society, Osaka, Japan, March 22, 2009.
- 5) 有村卓朗：特発性心筋症モデルマウスの作製とその病態解析－ヒトからマウスへ、マウスからヒトへ－。第 30 回心筋生検研究会ミニシンポジウム，津，11 月 28 日，2008。
- 6) Arimura T: Identification of Novel Disease Genes for Hereditary Cardiomyopathy. The 11th Cardiovascular Genomics and Atherosclerosis Symposium Satellite Meeting, Seoul, Korea, November 1, 2008.
- 7) 有村卓朗、佐藤光希、久保 亨、岡本 洋、西 宏文、原田晴仁、古賀義則、土居義典、木村彰方：CARP およびタイチン N2A 領域内変異は肥大型心筋症を引き起こす。第 53 回日本人類遺伝学会，横浜，9 月 28 日，2008。

[その他]

研究室ホームページ

http://www.tmd.ac.jp/mri/mri-mpath/index_j.html
1

プレスリリース

「肥大型心筋症の新たな原因遺伝子を発見」
－心臓肥大の新たなメカニズムの解明で治療法の開発に道－
(<http://www.tmd.ac.jp/cmn/soumu/kouhou/news20090710.html>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有村 卓朗 (ARIMURA TAKURO)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教
研究者番号：50342887

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし