

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19276

研究課題名(和文)心筋症および心肥大を伴った心臓性突然死の原因遺伝子解析

研究課題名(英文) Mutational analysis of disease causing gene in sudden death cases with cardiomyopathy or cardiac hypertrophy

研究代表者

前田 一輔 (Maeda, Kazuho)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：40724761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：拡張型心筋症(DCM)の原因遺伝子として報告されているサイファー遺伝子(LDB3)及びRNA結合モチーフ蛋白遺伝子(RBM20)の解析においてそれぞれ肥大型心筋症(HCM)の原因遺伝子変異がすでに検出されたHCM例にDCMの原因として報告されている変異が検出された。また、心肥大例1例にもRBM20に新規の変異が検出され、HCMで検出報告のある変異の近傍に位置していた。以上より重複した各CMの原因遺伝子異常によるCM病態の重篤化及びRBM20のHCM原因遺伝子としての可能性が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We performed comprehensive genetic analysis of genes that would cause dilated cardiomyopathy (DCM) in sudden death with cardiomyopathies or concentric/dilatation hypertrophy. DCM-associated mutation was detected from one HCM case in LDB3 and other HCM case in RBM20. These HCM cases also had a mutation associated with HCM in other gene. In addition, a novel mutation was detected from one concentric hypertrophy case in RBM20. This mutation was located near to the mutation associated with HCM. These results suggested that multiple gene mutations associated with each cardiomyopathy would exacerbate cardiac function and RBM20 might be not only as DCM-causing gene but also as HCM-causing gene. Further investigation using more postmortem samples is need for proving this hypothesis and elucidating the molecular mechanism in the onset of cardiomyopathy.

研究分野：法医学

キーワード：拡張型心筋症 肥大型心筋症 心臓性突然死 遺伝子解析 サイファー遺伝子 RNA結合モチーフ蛋白遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

法医学で扱う異状死体の数は年々増加傾向にあり、心臓性突然死が多くの割合を占めている。その中でも若年者の突然死で最も頻度の高い疾患が心筋症 (CM) であると言われている。CM は心筋の機能異常などにより心肥大や心内腔の拡張をきたす疾患で、心筋サルコメア・サルコレンマを構成する蛋白をコードする遺伝子異常が原因とされているが、疾患全体として病因変異が多彩であり、未だ病因解明に至っていないのが現状である。また、心臓性突然死の中には CM と診断されていないものの心肥大を認める例も経験することからこれらの症例の遺伝子解析を行うことで心肥大のメカニズム解明並びに CM 発症へのプロセス解明にもつながることが期待される。そこで、これまでに解析した CM 例に加え、心肥大または心拡張を認めた症例についても遺伝子変異解析を行い、遺伝子異常による CM の病態解明並びに遺伝子解析による確定診断の可能性について検討する研究を企画した。

## 2. 研究の目的

これまで肥大型心筋症 (HCM) で報告されている原因遺伝子を中心に変異解析を行い、多くの変異を検出してきた。本研究では、拡張型心筋症 (DCM) で変異が報告されているラミン A/C 遺伝子 (LMNA)、サイファー遺伝子 (LDB3)、FHL2 遺伝子 (FHL2)、近年新たに DCM の原因遺伝子として発見された心臓特異的骨形成蛋白遺伝子 (BMP10) 及び RNA 結合モチーフ蛋白遺伝子 (RBM20) について遺伝子解析を行い、これまで遺伝子異常が確認されていない症例の原因遺伝子検索を行う。さらに検出されたミスセンス変異について *in silico* スクリーニング解析により蛋白質への影響を分析し、より詳細に変異と疾患との関連について検討することで病態解明を目指し、遺伝子解析による確定診断へと展開する研究基盤の確立を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象試料

ご遺族より同意を得た HCM14 例、DCM18 例、病歴に CM がなく、剖検時、求心性肥大 (CH) が認められた 31 例及び拡張性肥大 (DH) が認められた 17 例の血液および心筋を対象とした。各 CM は AHA Scientific Statement (Circulation 2006;113: 1807-1816) 及び ESC レポート (Eur Heart J 2008; 29: 270-276) に基づき、HCM は錯綜配列及び間質の線維化を伴った心室肥厚の増加による左室肥大、DCM は左室拡張、左心室収縮機能障害を診断基準とした。CH 及び DH については心重量が 500g 以上かつ心肥大また心拡張が認められた症例を対象とした。

### (2) シークエンス解析

NCBI のデータベースをもとに Primer を設計し、サンガー法により塩基配列を決定した。検出された遺伝子多型については疾患群と対照群間で有意差検定を行った。

### (3) *in silico* スクリーニング

シークエンス解析により検出されたミスセンス変異について配列の保存性、化学的特徴、蛋白質構造やドメイン情報をもとに変異の蛋白質機能に及ぼす影響を数値化する Polyphen-2 及び SIFT を用いて解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) ラミン A/C 遺伝子 (LMNA)

一塩基置換及びサイレント変異が各 5 ヶ所ずつ検出された。検出された一塩基置換のうち g.37209T>C 及び g.61613G>C は Exon 領域内のデータベースにない新たな変異であったが、蛋白質コード領域外であった。また、p.H566= は一塩基多型 (SNP) であったが、対照群との間に有意差は認められず、疾患との関連性は低いと考えられた。よって DCM 例も含め、全例で蛋白質機能に異常をきたす変異が検出されなかったことから LMNA は本研究で解析した症例の原因遺伝子ではないことが示唆された。

## (2) サイファー遺伝子 (LDB3)

5ヶ所のミスセンス変異, 1ヶ所のサイレント変異, 4ヶ所の一塩基置換が検出された. 検出されたミスセンス変異のうち 20歳代後半の HCM1 例で検出された p.D673N は PolyPhen-2 及び SIFT により蛋白質機能異常をきたす変異と判定された (図1, 表1). この変異は50歳以降に DCM を発症する遅発性の変異として報告されている. さらに本例はこれまでの検討で心室型ミオシン必須軽鎖遺伝子 MYL3 に HCM の原因遺伝子変異として報告のある p.A57G が検出されている. p.A57G は Ca 感受性を高めることで比較的低い Ca<sup>2+</sup>濃度下でも筋収縮を引き起こす結果, 心筋収縮亢進により HCM 発症に関与している. 本例のように HCM 例で DCM と HCM の原因遺伝子変異を重複して有している例の報告は殆どないが, どちらか一方の原因遺伝子を複数有する場合, 心筋症病態が重篤化することが報告されている. よって本例は若年であったため DCM 発症には至らなかったが, MYL3 及び LDB3 異常により HCM の重篤化が促進した可能性が考えられた.

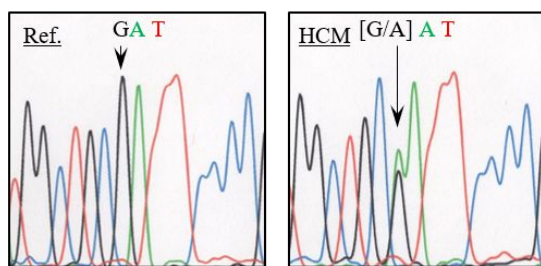


図1. HCM1 例に検出された p.D673N

表1 蛋白質機能異常をきたすと判定された変異

遺伝子	変異	PolyPhen-2	SIFT	症例	これまで検出した変異
LDB3	p.D673N	Probably Damaging	Damaging	HCM1例	p.A57G (MYL3)
RBM20	p.R1182H	Probably Damaging	Damaging	HCM1例	p.S593fs:1 (MYBPC3)
RBM20	p.G1217R	Probably Damaging	Damaging	CH1例	-

## (3) FHL2 遺伝子 (FHL2)

1ヶ所のミスセンス変異と2ヶ所の一塩基置換が検出され, いずれも SNP であった. このうち p.G48S は in silico スクリーニング解析で蛋白質機能異常をきたす変異として判定された. 有意差検定を行ったところ, DCM

群との間に有意差を認めた (p=0.03\*). p.G48S は DCM の原因遺伝子変異として報告されていることから DCM との関連が強く示唆され, 今後さらに症例数を増やし詳細に検討していく必要があると考えられた.

## (4) 心臓特異的骨形成蛋白遺伝子 (BMP10)

1ヶ所のサイレント変異が検出されたが, 対照群にも検出される SNP であった. 有意差検定においても疾患と対照群との間に有意差は認められなかった. よって BMP10 は本研究で解析した症例の原因遺伝子ではないことが示唆された.

## (5) RNA 結合モチーフ蛋白遺伝子 (RBM20)

5ヶ所のミスセンス変異, 2ヶ所のサイレント変異, 4ヶ所の一塩基置換が検出された. 検出された変異のうち p.R30=, p.R1057Q, p.E1223Q 及び 4ヶ所の一塩基置換すべてが SNP であり, いずれの変異も疾患群と対照群との間に有意差を認めなかった. 一方, HCM1 例で検出された p.R1182H は in silico スクリーニング解析により病原性変異として判定された (図2, 表1). 本例はこれまでの検討でミオシン結合蛋白 C 遺伝子 MYBPC3 に HCM の原因遺伝子変異として報告されている Ser593fs:1 も検出されている. p.R1182H はデータベース上, DCM で検出された報告はあるものの疾患との関連はまだ証明されていない. しかし, この変異は心筋の収縮・弛緩においてサルコメア全体のバランスを維持する蛋白質タイチンの選択的スプライシングの制御にとって重要な Zinc Finger domain 上に位置していることから DCM を引き起こす可能性が考えられた. LDB3 解析で検出した HCM 例と同様に本例も HCM 及び DCM の原因遺伝子変異をそれぞれ有したことで CM 病態を重篤化させた可能性が示唆された. また, CH 例1例で蛋白質機能に異常をきたすこれまで報告例のない新たな変異である p.G1217R が検出された (図3, 表1). 本例は心重量 575g で高度の求心性肥大を認め, 組

組織的にも心筋細胞の肥大や線維化を認め  
たが、錯綜配列は観察されなかった。  
p.G1217R は疾患と関連は証明されていない  
ものの HCM 例から検出報告のある p.P1211L  
の近傍に位置していることからこの領域の  
変異は心肥大と関連があると考えられた。さ  
らに病歴は不明だったが、大動脈の硬化が強  
かったことなどから高血圧が背景にあった  
ものと思われ、それも加わり、心肥大が増悪  
した可能性が考えられた。一部の DCM の原  
因遺伝子は HCM と重複するものも存在し、  
同一原因遺伝子のなかでも、変異部位により  
表現型が異なることが報告されていること  
から RBM20 は HCM の原因遺伝子でもある  
可能性が示唆された。

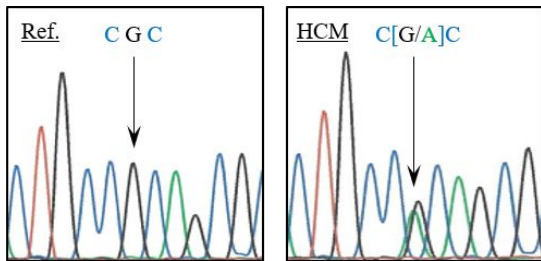


図 2. HCM1 例に検出された p.R1182H

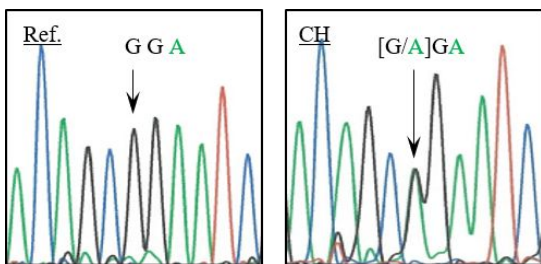


図 3. CH1 例に検出された p.G1217R

CM は若年者の突然死の一因であり、臨床  
のみならず、法医学分野においても重要であ  
る。原因遺伝子を特定することは死因診断の  
向上のみならず、家族へのフィードバックに  
より予防医学にも貢献するものと考えられ  
る。本研究結果から重複した各 CM の原因遺  
伝子異常による CM 病態の重篤化及び  
RBM20 の HCM 原因遺伝子としての可能性が  
明らかとなった。今後、症例数を増やしさら  
なる解析が必要であると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

村上千香子, 前田一輔, 入江 涉, 大石  
桃子, 佐々木千寿子, 中丸尚美, 中村茂  
基, 栗原克由.: 心臓性突然死の遺伝子解  
析 III -SCN5A 遺伝子の変異解析-, DNA  
多型 2015; 23: 177-180. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

Maeda K, Murakami C, Irie W, Sasaki C,  
Sato F, Kurihara K. Mutational analysis of  
LDB3 gene in sudden death cases with  
cardiomyopathy or cardiac hypertrophy.  
10th International Symposium Advances in  
Legal Medicine (ISALM). Düsseldorf  
(Germany), 2017.9.11.

前田一輔, 村上千香子, 入江 涉, 佐々  
木千寿子, 佐藤文子, 栗原克由. 心筋症  
及び心肥大・拡張例における心臓特異的  
骨形成蛋白質 10 及び RNA binding motif  
protein 20 遺伝子変異解析. 第 101 次日本  
法医学会学術全国集会, 長良川国際会議  
場(岐阜県岐阜市), 2017.6.7.

前田一輔, 村上千香子, 入江 涉, 佐々  
木千寿子, 中村茂基, 佐藤文子, 栗原克  
由. 心筋症及び心肥大・拡張事例におけ  
るラミン A/C 遺伝子およびサイファー  
遺伝子の変異解析. 第 66 回日本法医学  
会学術九州地方集会, 筑水会館(福岡県  
久留米市), 2016.10.14.

Maeda K, Murakami C, Irie W, Sasaki C,  
Oishi M, Nakamaru N, Nakamura S,  
Kurihara K. The case of 2 sibling that  
identified not only by DNA profiling. 26<sup>th</sup>  
World Congress of the International Society  
for Forensic Genetics (ISFG). Krakow  
(Poland), 2015.8.31.

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

前田 一輔 (Maeda, Kazuho)  
鹿児島大学・歯学域医学系・助教  
研究者番号: 40724761