

令和元年5月29日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10059

研究課題名(和文)先天性心疾患の網羅的遺伝子解析による心臓発生分子機構の解明

研究課題名(英文) Determination of the molecular mechanisms underlying heart development based on genome-wide analysis for congenital heart disease

研究代表者

犬塚 亮 (Inuzuka, Ryo)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00597560

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)：円錐動脈幹奇形と肥大型心筋症の家系における網羅的ゲノム解析と情報科学的解析による候補遺伝子探索を経て選定した機能未知遺伝子LZTR1について、CRISPR-Cas9システムを用いた遺伝子改変疾患動物モデリングによる*in vivo*機能解析を行った。LZTR1改変ゼブラフィッシュのヘテロ欠失体の交配によりホモ化に成功し、組織学的解析によって、LZTR1ホモ欠失ゼブラフィッシュの心臓表現型は患者病態と同様に心室肥大を再現していた。免疫組織染色によって、LZTR1の下流シグナルの一つとして、ERKを同定し、本疾患のRAS/MAPK症候群(Noonan症候群類縁疾患)とのオーバーラップが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、RAS/MAPK症候群関連心臓病におけるLZTR1の重要性が明らかになった。本研究で作出された、疾患モデルゼブラフィッシュは今後RAS/MAPK症候群関連心臓病の病態生理の解明に役立つことが期待される。特に、ゼブラフィッシュから得られる単離心筋細胞は、哺乳動物のそれと異なり、中長期培養、薬剤刺激、RNA阻害実験に適しており、RAS/MAPK症候群関連心臓病の細胞レベルの病態生理を解析する上で、最適なプラットフォームを提供してくれると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Based on genome-wide analysis and bioinformatic analysis, LZTR1 was selected as a candidate gene for a pedigree with conotruncal anomaly and hypertrophic cardiomyopathy. We performed *in-vivo* functional analysis for LZTR1 based on zebra fish model using the CRISPR-Cas9 system. A chimeric F0 mutant harboring a 7bp deletion germline allele was identified and backcrossed to wild-type fish to obtain F1 heterozygotes (Lztr1del/+). F1 heterozygotes were crossed to generate F2 homozygous mutants (Lztr1del/del), which recapitulated hypertrophic cardiomyopathy. Further, immunohistochemical analysis using anti-phospho-ERK antibody indicated active RAS/MAPK signaling, the deleterious signature of NS-associated hypertrophic cardiomyopathy.

研究分野：小児循環器

キーワード：先天性心疾患 RAS/MAPK症候群関連心臓病 心臓発生 ゼブラフィッシュ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天性心疾患は出生約 100 人に 1 人の割合で発症する最も頻度の高い先天性奇形である。手術治療成績は全体として格段に向上してきたものの、一部の重症心疾患患児の長期生命予後はいまだに不良であり、それらの患者の治療には莫大な医療費がかかっている。先天性心疾患の発症を予防することは究極の治療であるが、そのためには発症分子機構を解明し、易罹患性にかかわる関連遺伝子を同定することが急務と考えられる。従来、先天性心疾患は遺伝的因子と環境的因子の相互作用により生じると漠然と理解されてきていたが、分子遺伝学および疫学の進歩発達により、遺伝的因子についての詳細なメカニズムが明らかになりつつあり、先天性心疾患は心臓発生の分子機構の基幹的な部分と関わっている事がわかってきた。

先天性心疾患の遺伝的リスク (= 遺伝的要素の強さ) は疾患によって異なることが知られているが、特に心房内臓錯位症候群やファロー四徴症などの一部の疾患では、遺伝的リスクが約 10 から 80 倍に上昇しており、これらの疾患の成因には遺伝的要素がより強く関与していると考えられている。一方で、心房内臓錯位症候群の大部分、ファロー四徴症の約 2/3 の患者において、発症関連遺伝子や発症の詳細な分子機構はいまだ不明で、複数の遺伝子座による発病モデルやエピゲノムの関与が考えられている。近年行われた先天性心疾患患者における大規模な網羅的遺伝子解析では、ヒストン修飾因子などのエピゲノム関連遺伝子の変異が先天性心疾患の発症に関わっている事が明らかになった。また、ファロー四徴症の患者の約 10% に De novo のコピー数異常を認め、新規遺伝子の発見につながった。このように先天性心疾患の遺伝的要因を解析することは、心臓発生の分子機構を解明する事につながる。

2. 研究の目的

本研究では、1)先天性心疾患の患者の網羅的遺伝子解析を行い、先天性心疾患・小児期発症重症心筋症における未知の関連遺伝子を発見すること、また既知の遺伝子変異も含めその頻度を明らかにする。また、2)ゲノム変異の当該領域に存在する有用な遺伝子(群)について、発現ベクターを用いた遺伝子導入実験による機能解析で遺伝子の性状を解析し、関連遺伝子群のネットワークを含めた発症分子機構や心臓発生のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

東京大学医学部小児科および研究協力施設で経過観察中の先天性心疾患の患者。特に心房内臓錯位症候群などの複雑心奇形やファロー四徴症などの円錐部動脈幹異常、小児期発症重症心筋症を有する患者、多発奇形を有する患者、二親等以内に先天性心疾患の家族歴のある家系など、遺伝的要因が強いと考えられる患者およびその家族について i) 次世代高速シーケンサーによるエクソンキャプチャーおよび ii) 高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いたアレル別コピー数解析を行った。家系の連鎖解析、検出された変異の Pathway analysis を行い疾患関連遺伝子を同定した。また、ゲノムコピー数の変化のうちホモ欠失、LOH、UPD、gain および amplification の共通領域内に存在する有用な遺伝子についても、直接塩基配列決定法による変異の検証を行った。標的遺伝子の候補として同定された遺伝子群について CRISPR/Cas9 を用いたゼブラフィッシュの遺伝子改変ノックアウト変異体の表現型解析を行った。

4. 研究成果

線毛機能不全に合併した心房心室あるいは心室大血管構築不一致の症例の遺伝子解析から疾患原因遺伝子 DNAAF1 を同定し、これらの心奇形が内臓錯位症候群と同一スペクトラムに在る、という「heterotaxic heart defect」の概念を支持する結果として報告した。なお、発表時点で DNAAF1 遺伝子変異による内臓錯位は初めての報告であった。

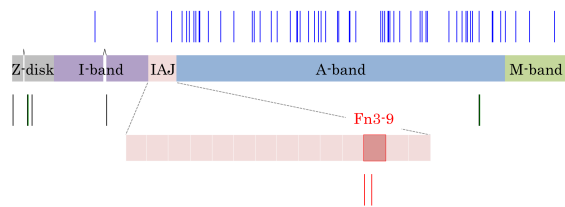
全身合併奇形を伴わない孤立性の大動脈弁上狭窄症の患者において未報の新規 ELN 遺伝子変異を同定し、学術集会において報告した。また、孤立性右室流出路狭窄という、閉塞性肥大型心筋症としては稀な表現型を取った幼児例において、サルコメア遺伝子上に 2 つの変異を同定し、両変異の相乗作用について考察した内容を、学術集会において報告した。

重症心不全を呈するミオパチー合併心筋緻密化障害の家系における MYL2 (通常は常染色体優性遺伝) のエクソン 7 の両アレル変異を見出し、その心筋・骨格筋病理の特長について学会で報告した。

新生児期に心不全のため死亡した肥大型心筋症の患者において、PTPN11 の変異を同定し LEOPARD 症候群と診断した。心筋の病理組織において Ki-67 陽性細胞の異常な増加を見出し、ヒトで初めて心筋細胞増殖の所見を報告した。

小児拘束型心筋症の患者の全エクソン解析ではタイチンの新規突然ミスセンス変異を見出した。近年、次世代シーケンサーの普及によりサルコメアを構成する巨大蛋白であるタイチンと心筋症の関連が明らかになっているが、図 1 のようにタイチン遺伝子の変異の大部分は拡張型心筋症や肥大型心筋症に関連し、タイチンに関連する拘束型心筋症の報告は我々の報告を含め 2 例しかなかった。さらに、これらの変異はタイチン IA junction (IAJ) の Fn3-9 に属する保存配列に集積しており、この領域が拘束型心筋症の発症において特異的な役割を担っていると推定されたため、この点について論文で報告した。

図 1. タイチン遺伝子変異と心筋症表現型の関係



拡張型心筋症

肥大型心筋症

拘束型心筋症

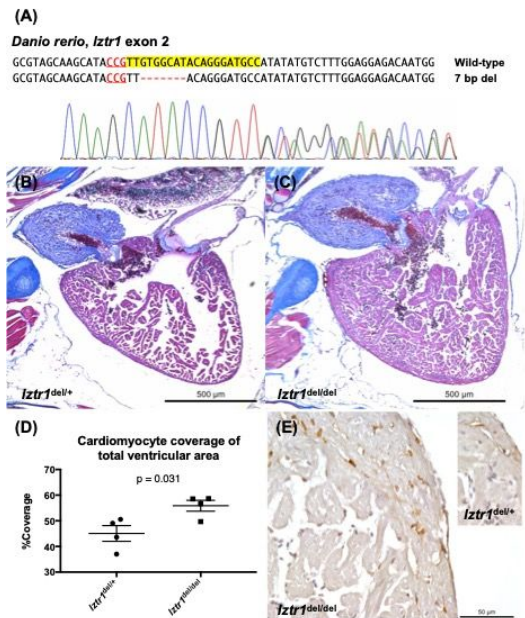
(当院症例を含めた既報 2 例)

先天性心疾患患者の網羅的ゲノム解析と情報科学的解析による候補遺伝子探索、さらにはアンチセンスモルフォリノによる一次スクリーニングを経て、選定した 2 つの機能未知遺伝子 LZTR1 および DNAH10 について、CRISPR-Cas9 システムを用いた遺伝子改変疾患動物モデリングによる in vivo 機能解析を行った。

LZTR1 は円錐動脈幹奇形と肥大型心筋症の家系から得られた候補遺伝子であるが、LZTR1 改変ゼブラフィッシュのヘテロ欠失体の交配によりホモ化に成功した。組織学的解析によって、LZTR1 ホモ欠失ゼブラフィッシュの心臓表現型は患者病態と同様に心室肥大を再現していた(図 2 A-D)。さらに免疫組織染色によって、LZTR1 の下流シグナルの一つとして、ERK を同定し、本疾患の RAS/MAPK 症候群 (Noonan 症候群類縁疾患) とのオーバーラップが示唆された。これら機能解析の結果については国際誌に投稿中である。

内臓錯位症候群の患者の解析から得られた候補遺伝子である DNAH10 に関しては、マウス受精卵の遺伝子改変を実施し、機能喪失アレルを得た。DNAH10 改変マウスの F0 個体は不妊となり、系統維持・継代が困難であった。仕方なく F0 個体を解析することとなったが、残念ながら DNAH10 改変 F0 マウスは目的の患者表現型 (内臓錯位) を呈さず、疾患原因遺伝子としての証拠を掴むことは出来なかった。現在は、疾患感受性を修飾する遺伝子 (modifier gene) としての関与を想定し、解析を続けている。

図 2



現在、疾患感受性を修飾する遺伝子 (modifier gene) としての関与を想定し、解析を続けている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- 1: Kizawa M, Nakagama Y, Shindo T, Ogawa S, Inuzuka R. Identification of a Novel Titin Variant Underlying Myocardial Involvement in Neurofibromatosis Type 1. *Can J Cardiol*. 2018 Oct;34(10):1369.e5-1369.e7. doi: 10.1016/j.cjca.2018.07.473.
- 2: Fujiwara T, Takeda N, Hara H, Morita H, Kishihara J, Inuzuka R, Yagi H, Maemura S, Toko H, Harada M, Ikeda Y, Kumagai H, Nomura S, Takimoto E, Akazawa H, Ako J, Komuro I. Distinct variants affecting differential splicing of TGFBR1 exon 5 cause either Loey-Dietz syndrome or multiple self-healing squamous epithelioma. *Eur J Hum Genet*. 2018 Aug;26(8):1151-1158. doi: 10.1038/s41431-018-0127-1.
- 3: Takeda N, Inuzuka R, Maemura S, Morita H, Nawata K, Fujita D, Taniguchi Y, Yamauchi H, Yagi H, Kato M, Nishimura H, Hirata Y, Ikeda Y, Kumagai H, Amiya E, Hara H, Fujiwara T, Akazawa H, Suzuki JI, Imai Y, Nagai R, Takamoto S, Hirata Y, Ono M, Komuro I. Impact of Pathogenic FBN1 Variant Types on the Progression of Aortic Disease in Patients With Marfan Syndrome. *Circ Genom Precis Med*. 2018 Jun;11(6):e002058. doi: 10.1161/CIRCGEN.117.002058.
- 4: Nakagama Y, Inuzuka R, Ichimura K, Hinata M, Takehara H, Takeda N, Kakiuchi S, Shiraga K, Asakai H, Shindo T, Hirata Y, Saitoh M, Oka A. Accelerated Cardiomyocyte Proliferation in the Heart of a Neonate With LEOPARD Syndrome-Associated Fatal Cardiomyopathy. *Circ Heart Fail*. 2018 Apr;11(4):e004660. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.117.004660.
- 5: Oshima T, Hara H, Takeda N, Hasumi E, Kuroda Y, Taniguchi G, Inuzuka R, Nawata K, Morita H, Komuro I. A novel mutation of NFIX causes Sotos-like syndrome (Malan

syndrome) complicated with thoracic aortic aneurysm and dissection. Hum Genome Var. 2017 Jun 1;4:17022. doi: 10.1038/hgv.2017.22. eCollection 2017.

〔学会発表〕(計9件)

1:Ogawa Y et al: Whole-exome sequencing identifies novel MYL2 mutations in a rare autosomal recessive myosinopathy. Weinstein 2018 Cardiovascular Development and Regeneration Conference, 2018

Kizawa M et al: The role of a TTN mutation in the pathogenesis of restrictive cardiomyopathy in a patient with Neurofibromatosis-1. Weinstein 2018 Cardiovascular Development and Regeneration Conference, 2018

2:Nakagama Y et al: Cardiomyopathy of dysregulated cardiomyocyte proliferation. Weinstein 2018 Cardiovascular Development and Regeneration Conference, 2018

3:物井 綾香ら: 乳児期発症ミオパチーに合併した心筋緻密化異常の病像 第40回心筋生検研究会 2018年

4:巻和佳奈ら: BMPR2 遺伝子に新生突然変異を有した肺動脈性肺高血圧症の孤発例. 第54回日本小児循環器学会総会・学術集会, 2018年

5:中釜 悠ら: AV discordance (ccTGA)の原因として, DNAH5 遺伝子変異を同定した一例. 第120回日本小児科学会学術集会, 2017年

6:中釜 悠ら: AV-, VA-discordance を合併した原発性線毛機能不全症の2例が示唆する、heterotaxy スペクトラムとしての大血管転位症の発症機序. 第53回日本小児循環器学会総会・学術集会, 2017年

7:大森 紹玄ら: 新規 ELN 遺伝子変異が同定されたエラスチン動脈症の一例. 第53回日本小児循環器学会総会・学術集会, 2017年

8:Yu Nakagama, Ryo Inuzuka: The role of next-generation sequencing in elucidating the pathogenesis of congenital heart disease. The 8th TAKAO International Symposium on Molecular Mechanism of Cardiopulmonary Disease, 2017

9:小川 陽介, 中釜 悠, 朝海 廣子, 進藤 考洋, 平田 陽一郎, 犬塚 亮, 岡 明: 二つのサルコメア遺伝子に変異を認め、孤立性右室流出路狭窄を呈した肥大型心筋症の一例. 第53回日本小児循環器学会総会・学術集会, 2017年

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 平田 陽一郎

ローマ字氏名: Hirata Yoichiro

所属研究機関名: 東京大学

部局名: 医学部附属病院

職名: 講師

研究者番号(8桁): 40447397

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 中釜 悠

ローマ字氏名: Nakagama Yu

研究協力者氏名: 中西 敏雄

ローマ字氏名: Nakanishi Toshio

研究協力者氏名: 竹内 純

ローマ字氏名: Takeuchi Jun

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。