

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04061

研究課題名(和文) ヒト重症心筋症変異ノックインマウス樹立～新規心不全モデル確立と病態・治療の解明

研究課題名(英文) Establishment of knock-in mouse with genetic mutation causing severe cardiomyopathy

研究代表者

森田 啓行 (Morita, Hiroyuki)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60323573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPR-Cas9システムを用いて1コピーの変異HOPX Lys23Asnアレルを有するノックインマウス(C57BL/6NJcl)を樹立した。患者病態を反映した新規心不全モデルマウスを確立し、そのモデルマウスを用いて病態解析をおこなった。ノックインマウスヘテロ型では36週齢時点で左心室Fractional Shorteningが30-35%へ低下した(対照群では60%台)。また、左心室内腔も対照群と比較して有意に拡大していた。興味深いことに、変異マウスの4-5割程度には心拡大・心機能低下をほとんどきたさない個体が存在した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

患者病態を反映した新規心不全モデルマウスを確立した。HOPX変異1コピーの遺伝子導入では、HOPX変異過剰発現マウスでみられたような重度の心不全をきたさないことが明らかになった。HOPX変異が単独で重症心不全をきたすということではなく、他の原因遺伝子変異ないしは環境要因のgenetic modifierとして作用し心筋症発症を誘導・促進している可能性をも考慮しなくてはならない。HOPX変異がどのような心筋転写制御の異常をもたらすか究明するため、胎仔心筋細胞を採取しsingle-cell RNAシーケンスをおこなった。今後はそのデータ解析を続行する予定である。

研究成果の概要(英文)：In this study, I established knock-in mouse (C57BL/6NJcl) with one copy of HOPX Lys23Asn variant allele using CRISPR-Cas9 system. I established the new mouse model which reflected the pathological condition of human heart failure and performed the analysis on the pathophysiology of heart failure using this mouse model. Left ventricular fractional shortening fell to 30-35% at 36 weeks of age in heterozygous knock-in mouse (versus 60% in the control group). In addition, the left ventricle was significantly enlarged as compared with controls. Interestingly, in 40-50% of heterozygous knock-in mice, systolic dysfunction and dilatation were not virtually observed. Knock-in with one copy of HOPX Lys23Asn variant allele could not induce the severe heart failure as was observed in the patient with one copy of HOPX Lys23Asn variant allele.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 心筋症

1. 研究開始当初の背景

拡張型心筋症は心室腔の拡張と収縮不全をきたす心筋疾患であり、治療抵抗性で心不全死亡に至ることが多い予後不良の疾患である。根本治療は心移植をにおいて他にない。慢性的なドナー心不足から、心移植待機中に命を落とすケースもあとを絶たない。拡張型心筋症の原因究明とそれに基づく治療法開発は喫緊の課題である。現在約2割のケースでのみ原因遺伝子変異が判明している。そのほとんどがサルコメア(心筋細胞内筋原線維)、Z帯(心筋細胞間隔壁)、心筋細胞骨格など心筋の構造タンパク異常である(Morita H, et al. *J Clin Invest.* 2005)。しかし、これら構造タンパクを治療のターゲットに応用するのは困難であることから、申請者は治療介入への展開を考える際に有効なターゲットとなりうる調節タンパクに着目して拡張型心筋症の原因遺伝子変異検索を進めてきた。なかでも転写因子は心筋の発生と分化・リモデリングに不可欠の因子であるが、拡張型心筋症患者における変異検索は進んでいない。一方、転写因子は胎児期に心臓の発生をつかさどるだけではなく、成人期においては刺激負荷に対する心筋の応答・適応にも関与している。転写因子異常と心筋の病的拡張との連鎖を知ることは、拡張型心筋症の病態生理解明に貢献するだけでなく、後天的ストレス(高血圧、虚血など)に引き続く中高年発症心筋異常リモデリングの機序理解にも資する。

申請者は拡張型心筋症早発家系において遺伝子スクリーニングをおこなった結果、HOPX 遺伝子にミスセンス変異 Lys23Asn(23番目のアミノ酸がリジンからアスパラギンに置換)を発見した。HOPX(Homeodomain-Only Protein X)は73アミノ酸からなる小さな転写制御因子である。それ自体はDNA結合配列を持たないが、おもにSRF(Serum Response Factor)と結合することでSRF依存性転写活性を抑制し転写制御作用を発揮するとされている(Shin CH, et al. *Cell* 2002)。胎生期から成人期までの心臓に発現がみられ、ANF(心房性ナトリウム利尿ペプチド)や心筋ミオシンの転写を制御している。次に申請者はこのヒトHOPX変異が拡張型心筋症の原因であることを証明するために「正常型HOPX過剰発現マウス」と「変異型HOPX(Lys23Asn)過剰発現マウス」とを作製し比較検討した。正常型HOPX過剰発現マウスでは心臓は正常であったが、変異型HOPX(Lys23Asn)過剰発現マウスでは心拡大、心筋間質線維化、心収縮不全など拡張型心筋症様の変化が観察され、1才齢までに約70%が心不全死亡した。

このようにヒトHOPX変異を過剰発現させたマウスモデル作製により、HOPX遺伝子変異が拡張型心筋症の原因であることを明らかにした。ヒト遺伝子変異を出発点に心筋転写制御の破綻が拡張型心筋症、重症心不全をきたすことを明示することができた。しかしながら過剰発現モデルではHOPX基礎発現量が極端に多いがゆえに、正常型HOPX過剰発現マウスではHOPXの生理的挙動(会合分子との相互作用など)が観察できず、また、変異型HOPX過剰発現マウスでは実際のヘテロ変異陽性患者における分子パスウェイの異常(会合分子との相互作用異常など)を観察するのは困難、という難点がある。実際に患者で惹起されている分子パスウェイ異常を正確に捉え最適治療を決定するには、より忠実に変異陽性患者の病態を反映するマウスモデルが必要と考える。

2. 研究の目的

HOPX(Homeodomain-Only Protein)は小分子心筋転写制御因子であるが、その作用機序の詳細は不明である。申請者は拡張型心筋症早発家系において HOPX 遺伝子変異を発見、さらにそのヒト変異を導入した変異型 HOPX 過剰発現マウスを作製し拡張型心筋症・重症心不全の発症を確認した。申請者が遂行した基盤研究(C)(平成 21-23 年度)では、HOPX 会合分子として十数種類の候補物質が同定された。本申請研究では、確実に効率のよい CRISPR/Cas9 システムを用いてヒト HOPX 変異ノックインマウスを樹立し新規心不全モデルを確立、そのモデルマウスを活用して HOPX 変異が心不全を惹起する機序および HOPX の生理作用の詳細を解明する。

3. 研究の方法

CRISPR-Cas9 システムを用いて 1 コピーの変異 *HOPX* Lys23Asn アレルを有するノックインマウス(C57BL/6NJcl)を樹立する。

経時的に心臓超音波検査 M モード法で心臓形態機能の観察をおこない、生存率の検討をおこなう。

HOPX 変異がどのような心筋転写制御の異常をもたらすか究明するため、胎仔心筋細胞を採取し single-cell RNA シークエンスをおこなう。

4. 研究成果

CRISPR-Cas9 システムを用いて 1 コピーの変異 *HOPX* Lys23Asn アレルを有するノックインマウス(C57BL/6NJcl)を樹立した。ノックインマウスヘテロ型に対して心臓超音波検査 M モード法を用いて生後 9 週齢から 40 週齢にかけて継続的に心臓収縮能を評価したところ、*HOPX* 変異マウスの FS (Fractional Shortening) は生後 9 週齢時点で既に約 45%へと軽度低下しており、36 週齢以降の時点では約 30-35%への低下をみた (対照群は 60%台)。また、左心室内腔も 3.0-3.5 mm へと有意に拡大していた (対照群は 2.5-3.0 mm)。興味深いことに、変異マウスの 4-5 割程度には心拡大・心機能低下をほとんどきたさない個体が存在した。同腹子(同胞)においても心拡大・心機能低下をきたす個体とほとんどきたさない個体とが混在することを観察した。なお、生後最長 1 年 2 ヶ月齢までの経過を観察し得たが、経過中の心不全死亡を認めなかった。

HOPX 変異 1 コピーの遺伝子導入では、*HOPX* 変異過剰発現マウスでみられたような重度の心不全をきたさないことが明らかになった。心機能低下をほとんどきたさない個体が存在する理由は不明であるが、これまでに得られた結果から判断すると *HOPX* 変異が単独で重症心不全をきたすということではなく、他の原因遺伝子変異ないしは環境要因の genetic modifier として作用し心筋症発症を誘導・促進している可能性をも考慮しなくてはならない。*HOPX* 変異がどのような心筋転写制御の異常をもたらすか究明するため、胎仔心筋細胞を採取し single-cell RNA シークエンスをおこない現在データ解析中である。また、大動脈縮窄心圧負荷に対する応答性など、ストレス応答の違いを検討し、*HOPX* 変異の genetic modifier としての意義も解明したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 14件）

1. 著者名 Kodera S, Morita H, Kiyosue A, Ando J, Komuro I.	4. 巻 83
2. 論文標題 Cost-effectiveness of percutaneous coronary intervention compared with medical therapy for ischemic heart disease in Japan.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 1498-1505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1253/circj.CJ-19-0148	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 Nakayama A, Morita H, Fujiwara T, Komuro I.	4. 巻 83
2. 論文標題 Effects of treatment by female cardiologists on short-term readmission rates of patients hospitalized with cardiovascular diseases.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 1937-1943
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1253/circj.CJ-19-0357	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 Yoshida Y, Nakanishi K, Daimon M, Ishiwata J, Sawada N, Hirokawa M, Kaneko H, Nakao T, Mizuno Y, Morita H, Di Tullio MR, Homma S, Komuro I.	4. 巻 74
2. 論文標題 Alteration of cardiac performance and serum B-type natriuretic peptide level in healthy aging.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American College of Cardiology	6. 最初と最後の頁 1789-1800
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.jacc.2019.07.080	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 該当する
1. 著者名 Ko T, Fujita K, Nomura S, Uemura Y, Yamada S, Tobita T, Katoh M, Satoh M, Ito M, Domoto Y, Hosoya Y, Amiya E, Hatano M, Morita H, Fukayama M, Aburatani H, Komuro I.	4. 巻 4
2. 論文標題 Quantification of DNA damage in heart tissue as a novel prediction tool for therapeutic prognosis of patients with dilated cardiomyopathy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JACC Basic to Translational Science	6. 最初と最後の頁 670-680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.jacbts.2019.05.010	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 Kaneko H, Morita H, Komuro I.	4. 巻 84
2. 論文標題 Beautiful harmony of the Japanese precious healthcare legacies for the new imperial era.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 371-373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1253/circj.CJ-19-1059	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 Tajima T, Morita H, Ito K, Yamazaki T, Kubo M, Komuro I, Momozawa Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Blood lipid-related low-frequency variants in LDLR and PCSK9 are associated with onset age and risk of myocardial infarction in Japanese.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41598-018-26453-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 -

1. 著者名 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 J-i, Imai Y, Nagai R, Takamoto S, Hirata Y, Ono M, Komuro I.	4. 巻 11
2. 論文標題 Impact of pathogenic FBN1 variant types on the progression of aortic disease in patients with Marfan syndrome.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circulation: Genomic and Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 e002058
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1161/CIRCGEN.117.002058	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 Kodera S, Morita H, Kiyosue A, Ando J, Takura T, Komuro I.	4. 巻 82
2. 論文標題 Cost-effectiveness of PCSK9 inhibitor plus statin in patients with triple-vessel coronary artery disease in Japan.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 2602-2608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1253/circj.CJ-17-1455	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 Nomura S, Satoh M, Fujita T, Higo T, Sumida T, Ko T, Yamaguchi T, Tobita T, Naito AT, Ito M, Fujita K, Harada M, Toko H, Kobayashi Y, Ito K, Takimoto E, Akazawa H, Morita H, Aburatani H, Komuro I.	4. 巻 9
2. 論文標題 Cardiomyocyte gene programs encoding morphological and functional signatures in cardiac hypertrophy and failure.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41467-018-06639-7	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 Morita H, Komuro I.	4. 巻 379
2. 論文標題 Outcomes of cardiac screening in adolescent soccer players.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 New England Journal of Medicine	6. 最初と最後の頁 2083-2084
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1056/NEJMc1813056	査読の有無 無
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 Nakao T, Morita H.	4. 巻 58
2. 論文標題 Omega-3 polyunsaturated fatty acid and coronary atherosclerotic plaques.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 837-839
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.17-552.	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 Tobita T, Nomura S, Morita H, Ko T, Fujita T, Toko H, Uto K, Hagiwara N, Aburatani H, Komuro I.	4. 巻 7
2. 論文標題 Identification of MYLK3 mutations in familial dilated cardiomyopathy.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-17769-1.	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 Morita H, Komuro I.	4. 巻 59
2. 論文標題 Heart failure as an aging-related phenotype.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 6-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.17-519.	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 Tobita T, Nomura S, Fujita T, Morita H, Asano Y, Onoue K, Ito M, Imai Y, Suzuki A, Ko T, Satoh M, Fujita K, Naito AT, Furutani Y, Toko H, Harada M, Amiya E, Hatano M, Takimoto E, Shiga T, Nakanishi T, Sakata Y, Ono M, Saito Y, Takashima S, Hagiwara N, Aburatani H, Komuro I.	4. 巻 8
2. 論文標題 Genetic basis of cardiomyopathy and the genotypes involved in prognosis and left ventricular reverse remodeling.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1998
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-20114-9.	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 Nakayama A, Morita H, Nagayama M, Hoshina K, Uemura Y, Tomoike H, Komuro I.	4. 巻 7
2. 論文標題 Cardiac rehabilitation protects against the expansion of abdominal aortic aneurysm.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 e007959
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.117.007959.	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1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 森田啓行
2. 発表標題 循環器領域における分子病態研究の新展開
3. 学会等名 第54回日本臨床分子医学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔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
研究 分担 者	中山 敦子 (Nakayama Atsuko) (60529147)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	