

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08684

研究課題名(和文)心筋症の遺伝的病因に基づく新規予防、治療法の開発

研究課題名(英文)Development of genetic etiology-based prevention and novel therapy for cardiomyopathy

研究代表者

林 丈晴 (HAYASHI, Takeharu)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：90287186

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)：難治性心不全の主たる原因である心筋症の病因及び新規治療法開発を行った。(1)肥大型心筋症(HCM)の新規原因遺伝子Xをコードする蛋白は、薬剤刺激による培養心筋細胞の肥大を抑制し、X遺伝子変異を有する培養心筋細胞では心肥大が誘発されるが、X投与により抑制された。今後さらにXによる治療法の開発を進める。(2)小児でのHCMや拘束型心筋症では、家族歴の有無に関わらず、高い確率でサルコメア遺伝子を中心とした原因変異が同定された。(3)予後の悪い亜型である心室中部閉塞型HCMでは、同定される原因変異はサルコメア遺伝子以外のもも多く、通常のHCMとは異なる要因で病態を形成していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

若年性心臓突然死の代表疾患である肥大型心筋症(HCM)の遺伝子解析により同定した新規の原因遺伝子Xをコードする蛋白は、新規の肥大抑制因子であることが示され、今後Xを用いた新たな治療開発を進めることとする。また、小児HCMでは、成人HCMとは異なり家族歴が明らかでなくとも、原因変異が判明すること、さらに、予後が悪い心室中部閉塞型HCMは通常のHCMとは異なる原因遺伝子の変異を有していることが多いことも判明し、予防的側面から遺伝子解析が貢献する可能性がある。新たな予防、治療開発へ向けて意義のある成果である。

研究成果の概要(英文)：We investigated the etiology of cardiomyopathy and developed a new therapy.

(1) The protein encoding the new causative gene X of hypertrophic cardiomyopathy (HCM) suppressed the hypertrophy of cultured cardiomyocytes induced by some compounds, and cardiac hypertrophy was induced in cultured cardiomyocytes having the X gene mutation, but it was suppressed by the X administration. We will continue to develop therapy using X. (2) Pediatric HCM and restrictive cardiomyopathy were found to carry cardiomyopathy-associated mutations at a high rate, with or without a family history, most of the mutations were identified in the sarcomere gene. (3) HCM with mid-ventricular obstruction was a high-incidence adverse event subtype in which patients carried a relatively low frequency of disease-associated gene mutations in the gene encoding sarcomere, but a relatively high frequency of disease-associated genes in dilated cardiomyopathy, suggesting a different etiology from usual type of HCM.

研究分野：循環生理学 分子遺伝学

キーワード：心筋症 原因遺伝子解析 ゲノム創薬

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

世界的な高齢化、生活習慣病の増加を背景に心不全の世界的増加は著しく、その管理、治療は個々の生命予後と直結している。心不全は古くから、収縮障害を治療主眼として考えてきたが、最近の報告では収縮能の保たれた心不全、いわゆる拡張障害によるものも、収縮障害同様に予後が悪いことが判明した。収縮障害はこれまで、様々な薬剤、デバイスが開発され予後は改善してきたが、拡張障害には予後を改善する薬剤は現状存在しない。心不全研究の良いモデルとして遺伝性心筋症が挙げられるが、大きく分けて 2 つの病型、肥大型心筋症(HCM)と拡張型心筋症(DCM)に分けられる。特に HCM は 0.2%と遺伝性循環器疾患として最も高い有病率を示す。HCM の病態は心肥大と拡張障害であり、若年性の心臓突然死の最も頻度の高い原因疾患であることは問題であり、早期診断し突然死予防を講じることが必要である。一方で DCM の病態は進行性の収縮障害と左室拡大であり、重症心不全が多い。これらの疾患の原因から病態を深く解析することで、複合的な要因で生じるさらに多くの心不全病態を説明し、予防や新規治療法に応用できると考える。

これまでに、我々は HCM や DCM を中心に多くの新たな心筋症原因遺伝子を世界に先駆けて発見し、その変異による機能変化について報告してきた。しかしながら、現時点でも、遺伝性肥大型心筋症の約 40%、遺伝性拡張型心筋症の 70%で原因遺伝子は解明されておらず、未知の原因遺伝子を同定し、個々の病態解明を行っていくことにより、心筋症のみならず、心不全全体の新たな個別化予防、治療法創出につながると考えられる。また、心筋症のさまざまな亜型、特に予後が悪い集団での遺伝子変異を同定し、臨床病態を明らかにしていくことは、遺伝子型-表現型のデータ構築に重要な点である。

### 2. 研究の目的

本研究計画では、わが国における肥大型心筋症(HCM)および拡張型心筋症(DCM)を主とした心筋症の病因究明、新規治療法開発のため、(1)心筋症多発家系の網羅的変異解析から得た新規の原因遺伝子 X の心筋症発症メカニズムの解明及び新規治療法の創出 (2) 心筋症の既知遺伝子の原因変異解析、新規原因候補遺伝子について解析し、心筋症の新規発症メカニズムの解明や病因に基づく治療法の開発を行うことを主目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)心筋症多発家系の網羅的変異解析から得た新規の原因遺伝子 X の心筋症発症メカニズムの解明及び新規治療法の創出

これまでに主要な原因遺伝子に変異のない HCM 多発家系を対象として次世代シーケンサー(NGS)を用いたエクソーム解析を行い、発症者と非発症者との比較、公開されている一般集団の遺伝子多型データベースでの検討、そして家系内解析を行い新規 HCM 原因遺伝子 X の変異を同定した。さらに遺伝子 X に対し、数百名の日本人 HCM 発症者の変異解析を行い、複数患者に他の X 遺伝子での変異を見出した。遺伝子 X に変異を有する患者に、既知の 67 個の心筋症原因遺伝子には変異が見出されなかった。そして、これらの変異は、複数の in-silico 解析で機能変化が予測された。驚くべき事に遺伝子 X がコードしている蛋白はサイトカインファミリーに属する液性因子であるが、その機能は明らかでなく、受容体も判明していない。X は全身臓器に発現がみられるが、心筋や骨格筋に強く発現していた。遺伝子 X がコードされている蛋白はこれまで見つかっていない未知の肥大抑制因子であり、変異に伴う機能低下から肥大を引き起こしたという仮説のもとに、研究を進める。

(2) 心筋症の既知遺伝子の原因変異解析、新規原因候補遺伝子解析

国内共同研究施設から送られる心筋症患者の血液試料から DNA を抽出し、既知の 67 種の心筋症関連遺伝子を次世代シーケンサー (NGS)を用いて、体系的・網羅的に変異検索する。変異は国内外の公開されている一般集団の遺伝子多型データベース用いて抽出し、複数の in-silico 解析を行い、アリル頻度が低く変異による機能変化を伴う可能性の高いものを有意変異として抽出する。家族内解析もできる限り行い、浸透率や重複変異の状況、また *de novo* 変異について解析を行う。さらに既知の遺伝子に変異が検出されない原因不明症例について、候補遺伝子アプローチによる新規原因遺伝子の同定を行う。複数の候補遺伝子全長について NGS により解析を行い、アリル頻度が低く変異による機能変化を伴う可能性の高いものを有意変異として抽出する。さらに、新規遺伝子変異による病因を遺伝子に応じて検討する。

### 4. 研究成果

(1)心筋症多発家系の網羅的変異解析から得た新規の原因遺伝子 X の心筋症発症メカニズムの解明及び新規治療法の創出

複数種の培養心筋細胞を用いて複数の薬剤刺激により肥大を誘発し、X を投与したところいずれも肥大マーカーが低下した。また、培養心筋細胞にゲノム編集により X 遺伝子変異を作成すると心肥大マーカーが増加し、X 投与により肥大マーカーは抑制された。さらに、HCM 患者同様の X 遺伝子変異を有するマウスを、ゲノム編集により作成を行うと、心肥大を認めた。故に、X は新規の肥大抑制因子であると強く考えられた。引き続き、肥大抑制メカニズムの解明、及び

X 投与による治療法の開発を行ってゆく。

(2) 心筋症の既知遺伝子の原因変異解析、新規原因候補遺伝子解析

心筋症患者検体から得られた遺伝子に対する変異解析により多くの有意な遺伝子変異を見出したが、特に意義の高い成果を以下に列記する。

HCM としては世界で初めてとなるデスミン遺伝子の変異例について、発端者家系の遺伝子変異及び臨床像について経過をまとめ報告した。(Harada, Hayashi et al. *J. Hum. Genet.* 2018) これは HCM としては非常に稀である劣性遺伝での変異であった。つまり、発端者の両親はヘテロ接合体での変異を有していたが、未発症であった。発端者は当初は HCM として経過したが、のちに進行性のミオパチーを発症した。

小児での HCM と拘束型心筋症 (RCM) では、高い確率でサルコメアを中心とした原因遺伝子変異が同定された。特に、家族歴の明らかでない非家族性 HCM において、成人 HCM では原因遺伝子変異の同定確率は低いが、小児 HCM では非家族性であっても 77% に変異を同定された。小児での家族性 HCM の同定頻度は 80% と高いが、それと同様の高い確率で原因遺伝子変異を同定できることが明らかとなった。小児 HCM では *de novo* 変異や重複変異が多く、重症型である植え込み型除細動器 ICD を有する例や、乳児での発症例は、男児及び非家族性 HCM 例で多く、主に *MYH7* や *MYBPC3* の変異を有していた。(Hayashi et al. *J. Hum. Genet.* 2018)

さらに、非常に予後の悪く比較的稀な HCM の亜型である、心室中部閉塞型 HCM (HCM-MVO) について遺伝子解析を行なった。臨床経過を観察した 3 年間で約半数 (47%) に致死的事件を認めた。HCM-MVO では、67 個の心筋症関連遺伝子の解析で、原因が同定できたものは 44% であった。内訳は通常 HCM で頻度の高いサルコメア遺伝子変異は 21% と頻度は低く、むしろ DCM やその他の心筋症で見出される遺伝子変異を有する例を 18% に認めた。通常 HCM で認める非対称性心肥大 (ASH) を有する HCM-MVO 例は、ASH を有しない HCM-MVO に比べ、原因遺伝子変異の同定確率が高い傾向にあった、このように、HCM-MVO は、通常 HCM とは異なる要因でその病態を形成していることが示唆された。これらをまとめ、臨床データと関連付けて文献報告を行なった。(Inagaki, Hayashi et al. *J. Hum. Genet.* 2018)

NGS を用いた候補遺伝子解析により新規の心筋症の原因と考えられる遺伝子 A に欠損変異を DCM に、HCM に A のミスセンス変異を複数認めた。引き続き、細胞などを用いた機能解析を進めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hayashi Takeharu, Tanimoto Kousuke, Hirayama-Yamada Kayoko, Tsuda Etsuko, Ayusawa Mamoru, Nunoda Shinichi, Hosaki Akira, Kimura Akinori	4. 巻 63
2. 論文標題 Genetic background of Japanese patients with pediatric hypertrophic and restrictive cardiomyopathy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 989 ~ 996
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-018-0479-y	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 Murayama Rie, Kimura-Asami Mariko, Togo-Ohno Marina, Yamasaki-Kato Yumiko, Naruse Taeko K., Yamamoto Takeshi, Hayashi Takeharu, Ai Tomohiko, Spoonamore Katherine G., Kovacs Richard J., Vatta Matteo, Iizuka Mai, Saito Masumi, Wani Shotaro, Hiraoka Yuichi, Kimura Akinori, Kuroyanagi Hidehito	4. 巻 8
2. 論文標題 Phosphorylation of the RSRSP stretch is critical for splicing regulation by RNA-Binding Motif Protein 20 (RBM20) through nuclear localization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8970-8983
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-26624-w	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 Inagaki Natsuko*, Hayashi Takeharu*, Takei Yasuyoshi, Tanimoto Kousuke, Chikamori Taishiro, Kimura Akinori	4. 巻 63
2. 論文標題 Clinical and genetic backgrounds of hypertrophic cardiomyopathy with mid-ventricular obstruction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 1273 ~ 1276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-018-0509-9	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 Harada H*, Hayashi T*, Nishi H, Kusaba K, Koga Y, Koga Y, Nonaka I, Kimura A	4. 巻 63
2. 論文標題 Phenotypic expression of a novel desmin gene mutation: hypertrophic cardiomyopathy followed by systemic myopathy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 249-254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-017-0383-x	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 Tsujii N, Hayashi T, Hayashi T, Kimura A, Nishikubo T.	4. 巻 60
2. 論文標題 Barth syndrome associated with triple mutation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 385-387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.13517	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 Arimura T, Muchir A, Kuwahara M, Morimoto S, Ishikawa T, Du CK, Zhan DY, Nakao S, Machida N, Tanaka R, Yamane Y, Hayashi T, Kimura A.	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 Am J Physiol Heart Circ Physiol.	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) 0.1152/ajpheart.	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 Hayashi Takeharu	4. 巻 -
2. 論文標題 Hypertrophic Cardiomyopathy: Diverse Pathophysiology Revealed by Genetic Research, Toward Future Therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Keio Journal of Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2302/kjm.2019-0012-0A	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 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 林 丈晴、山田佳代子、谷本幸介、木村彰方.
2. 発表標題 日本人拡張型心筋症の原因遺伝子解析
3. 学会等名 第62回日本人類遺伝学会
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	木村 彰方  (KIMURA Akinori)  (60161551)	東京医科歯科大学・その他の部局等・特命副学長     (12602)	