

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02803

研究課題名（和文）全エクソン関連解析(ExWAS)を用いた新たな心房細動疾患経路・創薬標的の探索

研究課題名（英文）Search for the pathogenesis and drug target of atrial fibrillation based on ExWAS

研究代表者

古川 哲史 (Furukawa, Tetsushi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：80251552

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：心房細動の全エクソン関連解析(ExWAS)で得られたオッズ比が高く、アミノ酸置換をもたらすレアな1塩基多型(SNPs)の機能解析を、in vitro及びマウスモデルでのin vivoで解析を行った。高齢者に多く認められたsall3のSNPは、自律神経の交感神経・副交感神経の分化異常をもたらすことで心房細動発症リスクとなることが明らかとなった。若年者に多く認められたTks5のSNPは、マクロファージの遊走・浸潤の増強、これを介して炎症を惹起することで心房細動発症リスクとなることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心房細動は最も多い不整脈であり（患者数約100万人）、高頻度に脳卒中（心原性脳塞栓）を合併し、寝たきりの原因となるため、その治療が喫緊の社会問題となっている。全ゲノム関連解析では、1塩基多型が遺伝子外に存在することが多く、疾患との関連が低いことで創薬シーズを同定するに至っていない。全エクソン関連解析を用いることにより、疾患との関連が高く、アミノ酸置換を有する変異を2つ同定した。その機能解析から、これまで知られていなかった心房細動の新たな病態発現機構、創薬シーズを同定でき、心房細動の新たな治療戦略に役立つことが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Whole-exon association analysis (ExWAS) of atrial fibrillation (AF) yielded two

rare single nucleotide polymorphisms (SNPs) with high odds ratios and amino acid substitutions. Then, we carried out in vitro analysis with cultured cells and in vivo with genome-edited mice. We showed that the AF-sensitive sall3 SNP, which was identified in AF ExWAS performed in the elderly poses a risk of developing AF by causing abnormal differentiation of the autonomic nerves into sympathetic and parasympathetic. In terms of the AF-sensitive SNP of Tks5, which was identified in ExWAS in young people, is at risk of developing AF by enhancing the migration and infiltration of macrophage, resulting in induction of inflammation.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心房細動 全エクソン相関解析 自律神経 マクロファージ 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

近年、全ゲノム関連解析(GWAS)の展開で、日常的に罹患する「コモン疾患」の遺伝的リスクが次々に明らかとなり、GWASの第一義の目的『個別化医療』の展開への期待が高まっている。一方、副次的目的として期待される『新たな疾患経路・創薬シーズの確立』は、GWAS導入後10年以上経過するがほとんど実現されていない。その原因として、GWASで同定される遺伝子多型はオッズ比が低く病態発現への関与が弱いこと、多くの多型が非遺伝子領域に同定され標的分子が明確にならないこと、の2つが挙げられる。全エクソン関連解析(ExWAS)は、タンパクコード領域のエクソンに限定した解析であること、オッズ比の高いレア1塩基多型(SNPs)も対象とすることから、GWASの2つの問題点の克服が期待される。そこで、申請者は最も頻度の高い不整脈の心房細動を対象にExWASを実施した。期待通りオッズ比が高く、アミノ酸置換を伴う2つのSNPsを同定できた。さらに、これらはそれぞれ自律神経の分化、酸化ストレスに関する分子で、心房細動病態発現への関与も強く示唆された。

## 2. 研究の目的

本計画では、申請者自身が抽出した候補分子から心房細動の新たな疾患経路を解明し、創薬シーズ候補としての妥当性を立証する独創性の高い研究を展開する。次の3つの解明を目指している：

- 心房細動発症への自律神経関与の分子機構・遺伝子基盤の解明；
- 心房細動の発症へのAT-1受容体下流シグナルの関与の解明；
- ExWAS情報の創薬シーズ(コンパニオン診断薬も含む)としての妥当性の立証。

## 3. 研究の方法

### 自律神経の分化に関わる分子sall3に関する研究方法

予備実験で、sall3が心筋細胞には発現せず心臓神経節に発現することが観察された。そこで、sall3の表現型に関して、in vitro培養系とマウスモデルの2システムで検討する。

#### (i)in vitro培養系：

神経由来細胞株 Neuro2A に心房細動感受性 SNP に相当する sall3 変異を導入し、トランスクリプトーム解析を行う。これから、sall3 変異の表現型に対する洞察を、さらなる in vitro 解析を展開する。

#### (ii)マウスモデル：

CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて、心房細動感受性 SNP に相当する sall3 変異を有するノックインマウスを作製する。これを用いて、交感神経・副交感神経アゴニスト存在下で、圧負荷・Ang-II・高頻度ペーシングなどの心房細動誘発ストレスを加え、心房細動誘発率を比較検討する。

### 炎症に関わるtk5に関する実験方法

Tks5 は AT-1 受容体と NADPH オキシダーゼ(NOX)間のシグナル伝達に関わる分子であるとともに、単球・マクロファージの組織浸潤の細胞骨格変化に関することが知られている。そこで、レンチウイルスを用いて心房細動感受性変異を有する Tks5 を心筋由来細胞株 HL-1 および単球由来細胞株 RAW264.7 に導入し、ROS 産生、マクロファージ遊走能、組織浸潤能、および炎症性サイトカイン産生を測定する。

## 4. 研究成果

### 自律神経の分化に関わる分子sall3に関する研究成果

#### (i)in vitro培養系：

Neuro2A で sall3 をノックダウンすると、自律神経のうち交感神経への分化のマーカーであるチロシン水酸化酵素(TH)の発現が減少し、野生型 sall3 を過剰発現させると TH の発現が2倍以上に増加すること、心房細動感受性変異(V866A)を有する sall3 を発現させると、TH の発現がさらに 1.5 倍(コントロールに比べると3倍以上)増加することが分かった。以上から、in vitro 解析で sall3 が自律神経の交感神経への分化を誘導する転写因子であること、心房細動感受性 Sall3 V866A が交感神経への分化をさらに増強することが示された。

#### (ii)マウスモデル：

CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて、sall3 ノックアウト(KO)マウスと心房細動感受性 SNP に相当する sall3 変異(V866A)を有するノックイン(KI)マウスを作製した。

心拍変動解析を用いて自律神経機能を評価したところ、ノックインマウスでは交感神経活性が亢進していることが確認された(図1)。平常時の心電図では心房細動所見は認めなかったが、経食道高頻度ペーシングにて誘発を試みたところ、野生型マウスでは誘発は得られないのに対し、ノックインマウスでは約半数にて心房細動が誘発され、心房細動脆弱性が確

認められた。ExWASにて同定された新規心房細動感受性 SNP は自律神経、特に交感神経の機能変容を介して、心房細動発症と関連していることが示唆された。

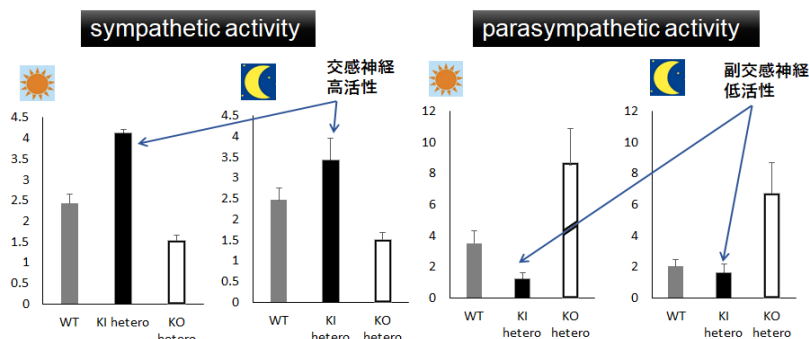


図1. テレメトリーECGを用いた自律神経活性化解析

左、交感神経解析、左左：日中（マウスの非活動帯）、左右：夜間（マウスの活動帯）  
右、副交感神経解析、左左：日中（マウスの非活動帯）、左右：夜間（マウスの活動帯）

### 炎症に関わるtks5に関する研究成果

我々は理化学研究所との共同研究で行った ExWAS で、オッズ比が 3.617 の SNPrs202011870 を同定した。別の日本人コホート（心房細動 3378 人、コントロール 641 人）で rs202011870 が心房細動発症と関連することが再現された。同 SNP は Tks5 と呼ばれる細胞質タンパク質上に存在し、396 番目の Lys を Arg に置換する (L396R)。

Tks5 をノックダウンした心筋細胞、L396R Tks5 をノックインした心筋細胞を作成したが、ROS の産生には有意な変化を求めなかった。

そこで、単球由来細胞株 RAW264.7 で野生型 Tks5、L396R Tks5 ノックインし、野生型 Tks5 KI マウス、L396R Tks KI RAW264.7 の表現型を比較した。トランスウェルを用いた遊走アッセイでは、L396R Tks KI RAW264.7 においてのみ遊走能が上昇した（図 2）。

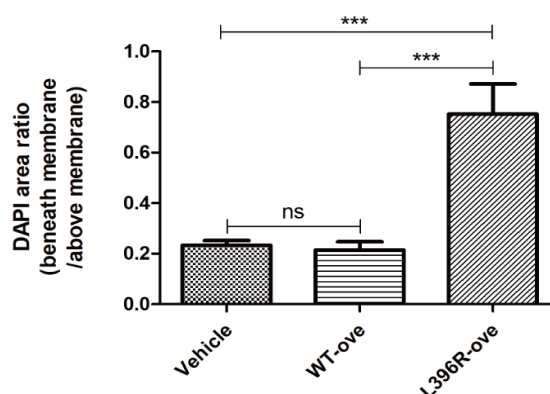
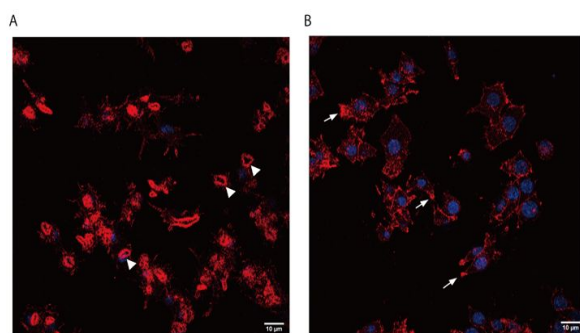


図 2. トランスウェルを用いた RAW264.7 の遊走アッセイ

フィルター膜上に RAW264.7 を播種し、24 時間後に底面を DAPI 染色し、その面積が遊走細胞数を反映すると考え、解析。



マクロファージの遊走には細胞骨格の変化による podosome と呼ばれる構造の出現が関与することが知られている。通常の RAW264.7 では phorbol ester による刺激を加えないと podosome は出現しないが、L396R Tks KI RAW264.7 では phorbol ester 刺激なしに podosome が出現することが示された(図 3)。

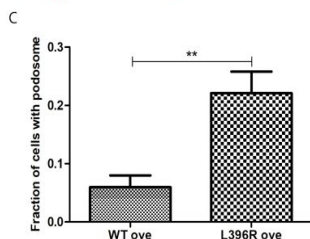


図 3. Podosome 形成

A, B, Rhodamine-Phalloidin 染色 .A は野生型 Tks5 を過剰発現させた RAW264.7, B は L396R Tks5 を過剰発現させた RAW264.7 . A ではアクチン線維は細胞内にリング状に存在し(矢先)、B ではアクチンは突起状に細胞から突出している(矢印) .

C, Podosome を有する細胞の割合 .

トランスウェル上に RAW264.7 細胞を播種し、共焦点蛍光レーザー顕微鏡でフィルター膜直下(図 4. Layer\_m)とフィルター膜から 6 mm 離れたレイヤー(図 4. Layer\_l)を観察した。野生型 Tks5 を過剰発現した RAW264.7(図 3A)に比べて、L396R Tks5 を過剰発現した RAW264.7 では Layer\_l での細胞数、細胞の断面積が大きくなっている。すなわち、細胞の podosome 形成が増強していることが示唆される。

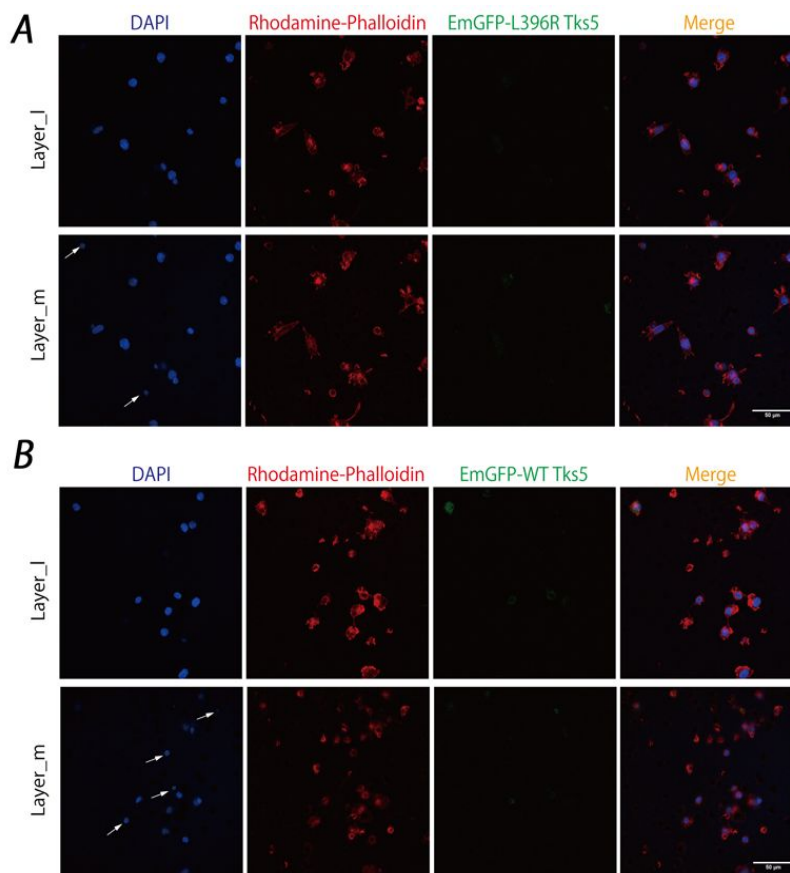


図 4. Podosome 形成に与える影響

A, 野生型 Tks5 を過剰発現した RAW264.7

B, L396R Tks5 を過剰発現させた Raw264.7

Layer\_m : フィルター膜直下、Layer\_l : フィルター膜から 6 mm 下

最後に炎症性サイトカイン発現への影響を調べた。L396R Tks5 を過剰発現させた RAW264.7 は、野生型 264.7 を過剰発現させた RAW264.7 よりも炎症性サイトカイン産生が有意に増加していた(図 5)

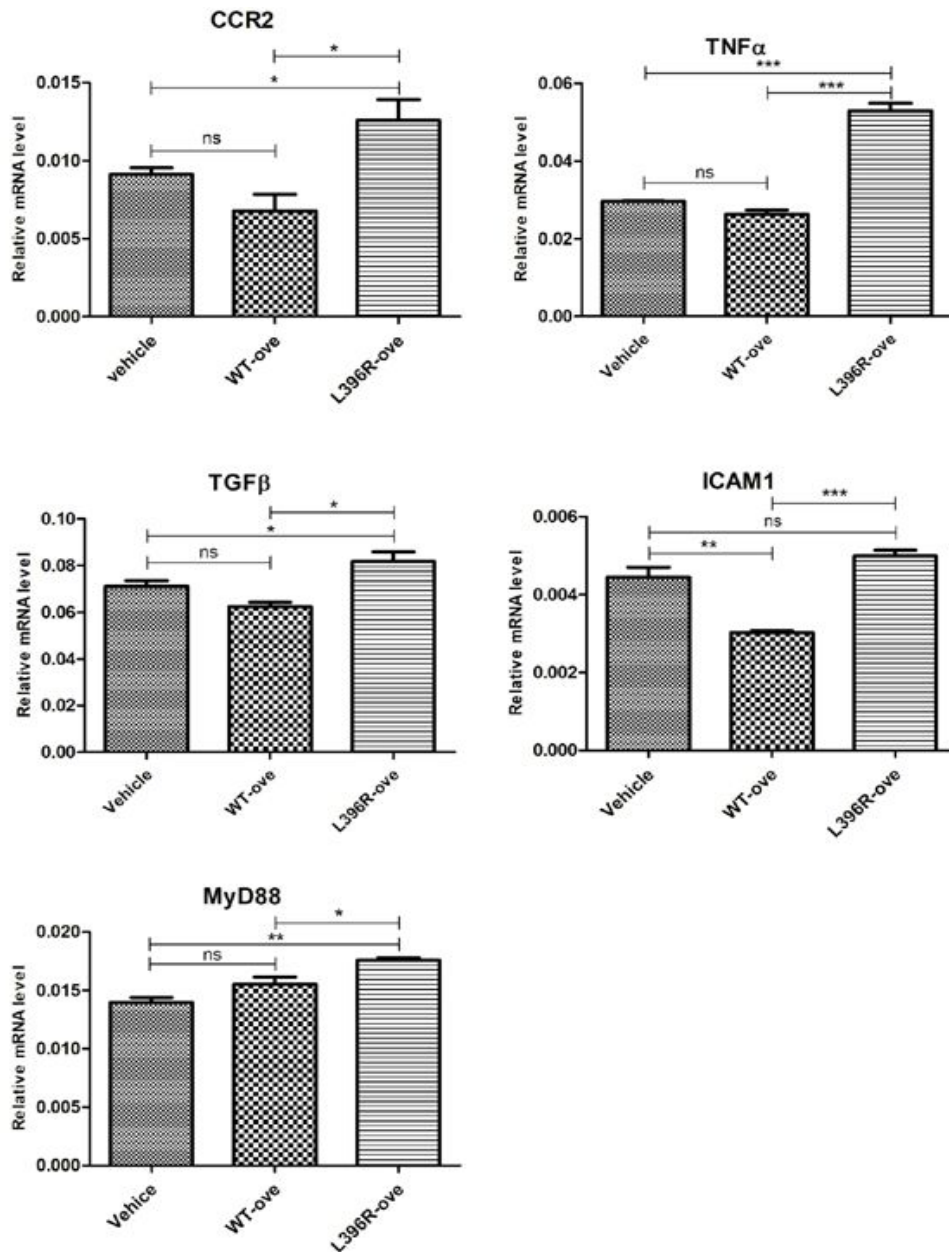


図 5. 炎症性サイトカイン産生に対する影響

以上、Tks5 はマクロファージに豊富に発現し、protein kinase C(PKC)活性化によって生じる podosome 形成、及びこれに伴う遊走・組織浸潤に関係することが示された。Tks5 L396R を有するマクロファージは、PKC 刺激がないコントロール状態でも podosome 形成、および遊走・組織浸潤が促進されることが示された。本研究は ExWAS から心房細動の新たな病態発現機構と創薬シーズを示すことに成功した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 110. Natusme Y, Oaku K, Takahashi K, Nakamura W, Oono A, Hamada S, Yamazoe M, Ihara K, Sasaki T, Goya M, Hirao K, Furukawa T, Sasano T	4. 巻 82
2. 論文標題 Combined analysis of human and experimental murine samples identified novel circulating microRNAs as biomarker for atrial fibrillation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 965-973
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circj.CJ-17-1194	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 111. Ihara K, Sugiyama K, Takahashi K, Yamazoe M, Sasano T, Furukawa T	4. 巻 132
2. 論文標題 Electrophysiological assessment of murine atria with high-resolution optical mapping	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 56478
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/56478	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 112. Okada J, Yoshinaga T, Kurokawa J, Washio T, Furukawa T, Sawada K, Sugiura S, Hisada T	4. 巻 275
2. 論文標題 Arrhythmic hazard map for a 3D whole-ventricles model under multiple ion channel block	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 British Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 3435-3452
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bph.14357	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 113. Hori Y, Tanimoto Y, Takahashi S, Furukawa T, Koshiba-Takeuchi K, Takeuchi JK	4. 巻 19
2. 論文標題 Important cardiac transcription factor genes are accompanied by bidirectional long non-coding RNAs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Genomics	6. 最初と最後の頁 967
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12864-018-5233-5	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kurokawa J, Fujizuka M, Hayashi E, Ashihara T, Kanda Y, Sekino Y, Furukawa T
2. 発表標題 Effects of hydrogel culture substrate on contractile properties and gene expression profiles of human iPS cell-derived cardiomyocytes.
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Furukawa T, Okata S, Yuasa S, Suzuki T, Makita N, Kurokawa J, Egashira T, Yamakawa H, Seki T, Aizawa T, Hashimoto H, Kuroda Y, Tanaka A, Yae K, Murata M, Aiba T, Shimizu W, Horie M, Kodama I, Ogawa S, Fukuda K
2. 発表標題 Disease modeling using iPS cells
3. 学会等名 第78回日本循環器学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sato Y, Satoh A, Nitta J, Honda Y, Kuroda S, Sekigawa M, Kanoh M, Suzuki M, Inaba O, Muramatsu K, Yamato T, Matsumura Y, Asakawa K, Ebana Y, Furukawa T, Hirao K, Isobe M
2. 発表標題 Impact of SNP on IL6R (rs7514452) for age at onset of atrial fibrillation
3. 学会等名 第78回日本循環器学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sekigawa M, Satoh A, Nitta J, Sato Y, Honda Y, Kuroda S, Kanoh M, Suzuki M, Inaba O, Muramatsu K, Yamato T, Matsumura Y, Asakawa K, Ebana Y, Furukawa T, Hirao K, Isobe M
2. 発表標題 Effect of SNP on 9q22 (rs6479562) on the progression from paroxysmal atrial fibrillation to persistent atrial fibrillation
3. 学会等名 第78回日本循環器学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 古川哲史	4. 発行年 2018年
2. 出版社 新潮社	5. 総ページ数 223
3. 書名 心房細動のすべて	

1. 著者名 古川哲史	4. 発行年 2018年
2. 出版社 成美堂	5. 総ページ数 159
3. 書名 ぜんぶわかる心臓・血管の事典	

〔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	竹内 純  (Takeuchi Jun)  (10451999)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授   (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------