

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17564

研究課題名(和文) Duchenne型筋ジストロフィーの心機能障害におけるアクチニン3多型の病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathophysiology of ACTN3 R577X polymorphism in cardiac dysfunction of patients with Duchenne muscular dystrophy

研究代表者

永井 正志 (Nagai, Masashi)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：50813929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)： -アクチニン-3をコードするACTN3遺伝子の一般的なヌル変異体(R577X)とデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)の心臓表現型の相関を調べた。163人のDMD患者のACTN3遺伝子型を決定した。ACTN3 XX null遺伝子型と他の遺伝子型を比較し、null遺伝子型は左心室拡張のリスクが高いことを示した(ハザード比9.04)。この研究はACTN3 XX null遺伝子型がデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)における左心室拡張の早期発症と関連していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)において拡張型心筋症(DCM)は主たる死因であり、その罹患率を下げることはDMDの予後改善に重要である。我々の研究結果はACTN3 null遺伝子型のDMD患者は左心室拡張リスクが高く(ハザード比9.04)、DCMの早期進行との間に関連性があることを明らかにした。この結果は、心臓の転帰を改善するためにDCMの発症リスクが高いACTN3 null遺伝子型のDMD患者は現在推奨されるよりも早期から頻繁に心臓評価を受ける必要があることを示唆しており、新たな心臓評価プロトコルが提案される。

研究成果の概要(英文)：Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a fatal progressive muscle-wasting disease caused by mutations in the DMD gene. Dilated cardiomyopathy is the leading cause of death in DMD. A common null variant (R577X) in the ACTN3 gene, which encodes -actinin-3, has been studied in association with muscle function in healthy individuals, however not yet examined with cardiac phenotype in DMD. We determined the ACTN3 genotype in 163 patients with DMD and examined the correlation between ACTN3 genotypes and echocardiographic findings in 77 of them. The genotypes 577RR(RR), 577RX(RX), and 577XX(XX) were identified in 13 (17%), 44 (57%), and 20 (26%) of 77 patients, respectively. We estimated cardiac involvement-free survival rate analyses using Kaplan-Meier curves. The left ventricular (LV) dilation (LVd>55 mm)-free survival rate was significantly lower in XX null genotype patients (P<0.01). XX null genotype showed a higher risk for LV dilation (hazard ratio 9.04).

研究分野：小児科

キーワード：DMD ACTN3 拡張型心筋症

1. 研究開始当初の背景

(1) デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は最も頻度の高い遺伝性筋萎縮症である。ジストロフィン(DMD)遺伝子変異により発症し、致死性の進行性筋力低下を主症状とする。DMDには様々な筋外合併症を呈するが、なかでも心筋症はDMDの進行に伴いほとんどの症例に認め、死因の大部分を占める重篤な合併症である。

(2) DMDの心筋症において左室拡大は主たる特徴であり、10代前半から20代にかけて顕在化する。左室拡大の結果、拡張型心筋症(DCM)の病態を呈し、心不全、心臓死に至る。DCMへの進行を防ぐため、ガイドラインでは患者全員に、診断時または学童期からの定期的な心機能評価を推奨している。心機能障害を認める場合にはアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害剤などによる早期介入が推奨されている。心合併症の管理が確立してきたにもかかわらず、DCMは依然として主たる死因であり、さらなる知見が望まれている。

(3) ACTN3遺伝子はサルコメア構成蛋白の一つである -アクチニン3をコードする。ACTN3遺伝子には高頻度多型(R577X)が存在し、ヌル遺伝子型(577XX)では -アクチニン3が欠損する。ヒト骨格筋を用いたウエスタンブロットでは、 -アクチニン3発現はヘテロ多型(p.577R / p.577X)で減少し、ヌル多型(p.577X、ホモ接合体)では欠損していた。<sup>1</sup>

(4) -アクチニン3欠損は一般集団において筋力低下との関連が報告されているが、DMD表現型との関連は明らかでない。これまで、ACTN3遺伝子型とDMD患者の筋力との関連が報告され、ACTN3遺伝子がDMDの疾患修飾因子であることが示唆された。<sup>2,3</sup>さらに、ACTN3遺伝子型と慢性心不全患者の生存との関連が報告され、ACTN3遺伝子は心機能と関連することが示唆された。<sup>4</sup>

2. 研究の目的

(1) 日本人DMD患者における、ACTN3遺伝子型と心合併症との関連を検討する。

3. 研究の方法

(1) 単一施設における後方視的研究である。1992年6月から2018年3月に神戸大学医学部附属病院に通院歴のあるDMD患者の診療録を後方視的に検討した。DMDの診断はDMD遺伝子変異の同定によって行われた。解析対象は、1)ゲノムDNAが保存されているもの、2)当院で定期的な心エコーを受けているもの、3)初回検査時に心機能障害または拡張型心筋症を示す所見がないものとした。ACTN3遺伝子型は直接シーケンス法で決定した。左室拡大は左心室拡張末期径(LVDd) >55 mmと定義し、心機能障害をLV駆出率(EF) <53%と定義した。

(2) Shapiro-Wilk検定で正規性を検定し、正規分布ではStudent's t検定またはANOVAを用い、非正規分布ではMann-Whitney U検定またはKruskal-Wallis検定を用いて統計解析を実施した。名義尺度はFisherの正確確率検定を用いた。Kaplan-Meier法で生存率を分析し、log-rank検定で比較した。ハザード比はMantel-Haenszel検定で算出した。全ての統計解析ではp<0.05を統計的に有意とした。

4. 研究成果

(1) 当院に通院歴のある452人のDMD患者のうち、163人にゲノムDNAの保存があり、ACTN3遺伝子型を解析した。163人のうち74人は当院で定期心エコー検査がなく、除外された。さらに12人は初回心エコー時に心機能障害を認めたため除外された。最終的に77人の患者が解析対象となった。

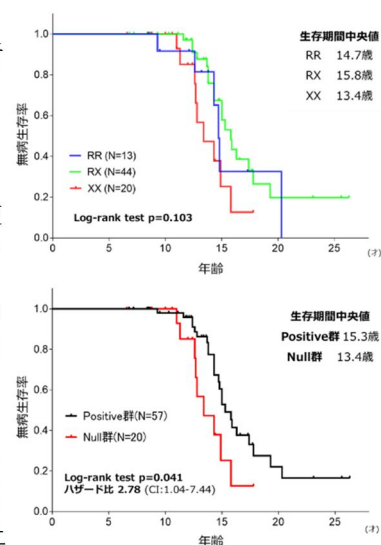
(2) 解析対象の77人を含む、163人のDMD患者のACTN3遺伝子型を解析した。野生型であるc.1729C(p.577R)をホモ接合性に有する場合の遺伝子型をRRとした。高頻度バリエーションc.1729C>T(p.R577X)を、ヘテロ接合性に有する場合をRX、ホモ接合性に有する場合をXXとした。遺伝子型RR、RX、XXは、それぞれ31人(19%)、84人(52%)、48人(29%)であった。R577Xのアレル頻度は0.552で、Hardy-Weinberg平衡( $\chi^2=0.29$ ,  $p=0.87$ )に従っていた。また、解析対象の77人ではRR、RX、XXは、それぞれ13人(17%)、44人(57%)、20人(26%)であった。アレル頻度は0.545で、Hardy-Weinberg平衡( $\chi^2=1.79$ ,  $p=0.41$ )に従っていた。

(3) 3つの遺伝子型の臨床背景を比較した。初回心エコー年齢、最終心エコー年齢、経口プレドニゾン使用、ACE阻害剤使用、遮断薬使用、初回心エコーのLVDdやLVEFは遺伝子型間で有意差は認めなかった。

(4) -アクチニン3欠損が心機能に及ぼす影響を明らかにするために、77人のDMD患者を、XXをヌル遺伝子型(N=20)、RRおよびRXを陽性遺伝子型(N=57)と定義して2群に分類した。この2群間で前述の臨床背景に有意差は認めなかった。

(5) RR、RX、XXの3群の心機能障害の生存率について比較したところ、3群間で有意差は認めなかった( $p=0.103$ )。ヌル遺伝子型と陽性遺伝子型について比較した。ヌル遺伝子型と陽性遺伝子型の生存期間中央値はそれぞれ13.4歳と15.3歳であり、生存率は有意に低かった

図1.心機能障害(LVEF<53%)無病生存率



(p=0.041)。15歳の時点で、陽性遺伝子型の生存率が0.45に対し、ヌル遺伝子型の生存率はわずか0.13であった。ヌル遺伝子型はDMDにおいて心機能障害の早期発症と関連しており、ハザード比2.78(95%信頼区間、1.04-7.44)と心機能障害のリスクが高かった。(図1)

(6) 左室拡大について3つの遺伝子型で比較した。XXは左室拡大の早期発症と有意に関連していた(p=0.023)。左室拡大は12歳まですべての遺伝子型で認められなかったが、XXは13歳から生存率の低下を示した。20歳の生存率はXXではわずか0.29であり、RXは0.77と高い生存率を示した。驚くべきことにRRは21歳まで左室拡大を示さなかった。(図2)

(7) ヌル遺伝子型と陽性遺伝子型を比較すると、左室拡大の生存率はヌル遺伝子型が陽性遺伝子型よりも有意に低く(p=0.007)、ヌル遺伝子型は左室拡大について有意なリスクを有していた(ハザード比:9.04、95%信頼区間:1.77-46.20)。

(8) RRとその他(RXおよびXX)の心機能障害および左室拡大の無病生存率を比較したが、ともに2群で有意差は認めなかった(p=0.83およびp=0.19)。

(9) 本研究では、77人のDMD患者のACTN3遺伝子型を同定し、遺伝子型間の心機能障害と左室拡大の無病生存率を比較した。そして、ヌル遺伝子型で左室拡大が早期に進行することを明らかにした。この研究のDMD患者のR577Xのアレル頻度は東アジアの人口で報告された頻度(0.458-0.567)と同様であり、選択バイアスはないと考えられた。

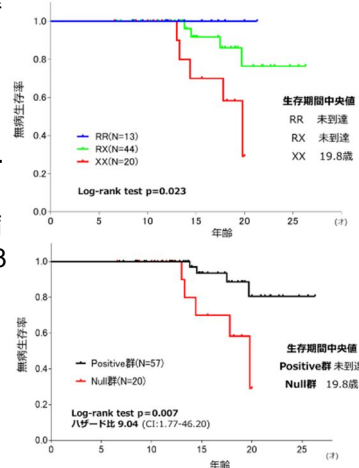
(10) -アクチニン3は、Zディスクの構成タンパクであるため、これまで、骨格筋機能について研究がなされてきた。しかしながら近年の研究では-アクチニン3は心筋や肺動脈平滑筋を含む心血管系の組織にも発現していることが報告されてきた。-アクチニン2と-アクチニン3はホモおよびヘテロ二量体として存在し、ZASPやミオチリン、タイチン、ピンクリンといった蛋白と結合する。ZASPやタイチン、ピンクリンの欠損によりDCMを引き起こすことが報告されており、-アクチニン3がこれらのタンパクとともに心機能に関連することが考えられる。DMDでは過度な運動により心機能が悪化することが予想される。健常人でヌル遺伝子型が下肢筋力と関連すると報告があるため、DMD患者においても-アクチニン3欠損骨格筋と心筋に関連があると考えられる。そのため、本研究で遺伝子型と歩行喪失年齢を比較したが有意差は認めなかった。DMDにおいて、ACTN3遺伝子型と歩行喪失年齢や、筋力などの関連を検討した研究はあるが、一定の見解は得られていない。現時点では、ACTN3遺伝子型が身体活動機能に影響を及ぼすということはできず、また-アクチニン3欠損骨格筋と心筋との関連について結論を出すことは出来ない。

(11) 心筋症はDMDにおける主要な死因であり、心筋症リスクを正確に予測することは心予後を改善するために不可欠である。しかしDMDの心筋症発症には個人差を認める。本研究ではヌル遺伝子型の患者の1人がDCMを非常に早期に発症していたため解析から除外された。この患者は8歳の初回心エコーでEFが48.3%と低下し、11歳で左室拡大を認めた。本研究の結果と合わせ、ヌル遺伝子型はDCMのリスクが高く、現在の推奨より頻回に心機能評価を受けるべきであることを示唆している。

DMDの診断時にACTN3遺伝子型を解析し、その他の遺伝子型は現在のガイドラインに従って管理し、ヌル遺伝子型については8歳までは年1回、以降は年2回の心機能評価を受けるべきである。この新しい心機能評価によりDMDの心予後を改善できると考える。

(12) 本研究のリミテーションとして単一の施設で行われた後方視的研究であること、コホートサイズが小さいことが挙げられる。

図2. 左室拡大(LVDd>55mm)無病生存率



#### <引用文献>

Hogarth MW, Garton FC, Houweling PJ, Tukiainen T, Lek M, Macarthur DG, et al. Analysis of the ACTN3 heterozygous genotype suggests that alpha-actinin-3 controls sarcomeric composition and muscle function in a dose-dependent fashion. *Hum Mol Genet* 2016;25:866-77.

Suminaga R, Matsuo M, Takeshima Y, Nakamura H, Wada H. Nonsense mutation of the alpha-actinin-3 gene is not associated with dystrophinopathy. *Am J Med Genet* 2000;92:77-8.

Hogarth MW, Houweling PJ, Thomas KC, Gordish-Dressman H, Bello L, Cooperative International Neuromuscular Research Group (CINRG), et al. Evidence for ACTN3 as a genetic modifier of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun* 2017;8:14143.

Bernardez-Pereira S, Santos PC, Krieger JE, Mansur AJ, Pereira AC. ACTN3 R577X polymorphism and long-term survival in patients with chronic heart failure. *BMC Cardiovasc Disord* 2014;14:90.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Masashi Nagai, Hiroyuki Awano, Tetsushi Yamamoto, Ryosuke Bo, Masafumi Matsuo, Kazumoto Iijima	4. 巻 26(10)
2. 論文標題 The ACTN3 577XX Null Genotype Is Associated with Low Left Ventricular Dilation-Free Survival Rate in Patients with Duchenne Muscular Dystrophy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cardiac Failure Home	6. 最初と最後の頁 841-848
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cardfail.2020.08.002	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 永井 正志、粟野 宏之、山本 哲志、坊 亮輔、西尾 久英、松尾 雅文、飯島 一誠
2. 発表標題 ACTN3 ヌル遺伝子型はDuchenne型筋ジストロフィーの拡張型心筋症の早期発症と関連する
3. 学会等名 第62回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masashi Nagai, Hiroyuki Awano, Tetsushi Yamamoto, Ryosuke Bo, Hisahide Nishio, Masafumi Matsuo, Kazumoto Iijima
2. 発表標題 The $\alpha$ -actinin-3 deficiency is related to early onset of dilated cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy patients
3. 学会等名 The World Muscle Society 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------