

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08177

研究課題名(和文)小児期発症重症心筋症の変異データベース構築と疾患モデル動物を用いた分子機構の解明

研究課題名(英文) Construction of a mutation database for childhood-onset severe cardiomyopathy and elucidation of molecular mechanisms using animal models of the 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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：小児期発症心筋症の変異データベースの構築：当院でフォローアップ中の心筋症症例、計22症例(21家系、DCM9例、HCM3例、RCM5例、LVNC5例)において全エクソーム解析を行い、10例(45%)で病原性のある変異を同定、5例(23%)でVUS、7例では既知の心筋症関連遺伝子に変異を認めなかった。
心筋症疾患モデリング：LZTR1の分子間相互作用の解析のため、培養細胞でのタグ付きLZTR1過剰発現系を用いてプルダウンアッセイを行い、二次元電気泳動で検出されたスポットに対して質量分析法による蛋白同定を試みたが、LZTR1の機能発現に関与する蛋白は同定されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児期発症心筋症症例における網羅的遺伝子解析を行う事で、成人期発症の心筋症の原因遺伝子との違いを明らかにすることが出来た。特に、小児期発症の重症拘束型心筋症例において、MYH7遺伝子の早期発症の機序に関わる可能性のある変異を認め、今後の変異と表現型の関連を調べる機能解析が有用である可能性が示唆された。
In vitroで行ったLZTR1の機能解析では、Noonan関連心筋症発症におけるLZTR1の役割を明らかにすることはできなかった。

研究成果の概要(英文)：(1) Establishment of a mutation database for childhood-onset cardiomyopathy: In a total of 22 cardiomyopathy cases (21 families, 9 DCM, 3 HCM, 5 RCM, 5 LVNC) under follow-up at our hospital, we performed whole exome sequencing and identified pathogenic mutations in 10 cases (45%), VUS in 5 cases (23%), and no mutations in 7 cases.
(2) Cardiomyopathy disease modeling: To analyze the molecular interaction of LZTR1, we performed a pull-down assay using a tagged LZTR1 overexpression system in cultured cells and attempted protein identification by mass spectrometry on spots detected by two-dimensional electrophoresis, but no proteins involved in functional expression of LZTR1 were identified.

研究分野：小児循環器

キーワード：心筋症 網羅的遺伝子解析 疾患モデリング iPS細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児期発症の重症心筋症は、根本的な治療がなく、現在心臓移植が唯一の治療となっている。小児の拡張型心筋症では心筋細胞肥大や間質線維化の所見が乏しく、アドレナリン 2 受容体の down regulation や増殖関連遺伝子の発現亢進など、成人の拡張型心筋症とは分子生物学的に異なった特徴を持つことが報告されている。また、小児期発症重症心筋症患者には孤発例が多く、成人と異なった遺伝学的背景があることが推定される。実際に小児の心筋症は遮断薬などの心不全治療薬に対する反応性が不良で、成人の心筋症と比べて予後が極めて不良である。現在、移植待機患者の増加・待機時間の長期化に伴い、補助人工心臓を装着しての待機による医療コストの増加や待機中の死亡が問題となっている。そのため小児期発症重症心筋症の病態の解明や治療の開発が急務である。

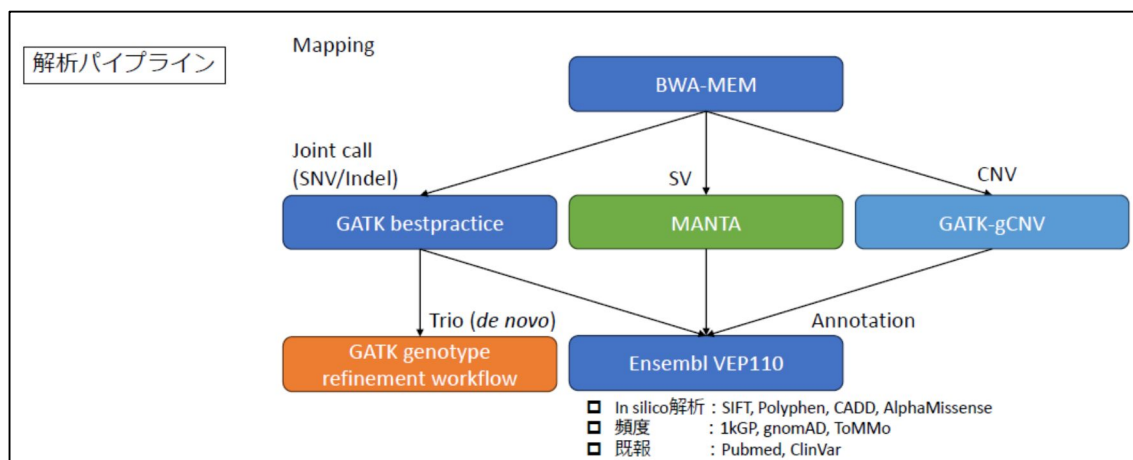
近年、次世代シーケンサーなどによる遺伝子解析技術の進歩により、成人の心筋症において、多くの関連遺伝子が見つかり、サルコメア関連蛋白の異常を含めた多彩な遺伝的背景が明らかになってきた。しかし関連遺伝子が多く、診療の一環として遺伝子解析することは困難で、未だマクロの形態分類に頼っているのが現状である。

2. 研究の目的

本研究の目的は 小児期発症重症心筋症における心筋症関連遺伝子の変異の頻度を明らかにし、遺伝子変異と表現型(心機能、心筋形態)の関係を明らかにすること。小児期発症重症心筋症に関わる遺伝子(変異)の機能について調べることで小児心筋症の発症分子機構を明らかにすること、である。

3. 研究の方法

小児期発症心筋症のゲノム異常の網羅的探索および変異データベースの構築：
東京大学医学部小児科で経過観察中の小児発症重症心筋症のエクソーム解析を行った。

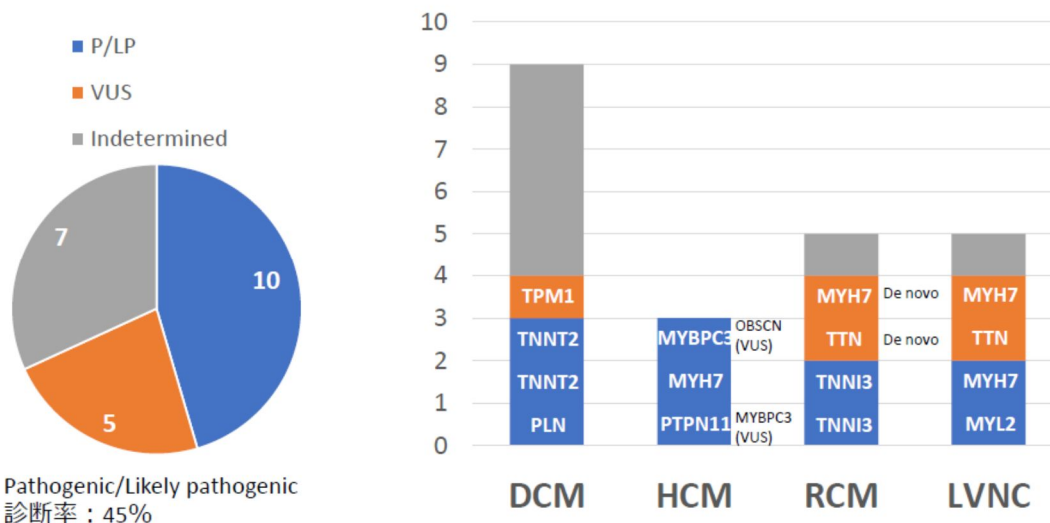


LZTR1 機能解析:

血管内皮 HUVEC を使った tube formation assay を構築し、LZTR1 の血管内皮における役割について解析を行った。また、LZTR1 の分子間相互作用の解析のため、培養細胞でのタグ付き LZTR1 過剰発現系を用いてプルダウンアッセイを行った。

4. 研究成果

小児期発症心筋症のゲノム異常の網羅的探索および変異データベースの構築：
当院でフォローアップを行っている心筋症症例、Total 22 症例 (21 家系、DCM9 例、HCM3 例、RCM5 例、LVNC5 例) において、全エクソーム解析を行った。10 例 (45%) で病原性のある変異を同定、5 例 (23%) で VUS、7 例では既知の心筋症関連遺伝子に変異を認めなかった。ミオパチーを伴う致死的心筋症の家系において、網羅的遺伝子探索を行い MYL2 遺伝子の複合ヘテロ接合性変異を検出し、日本人において初めての劣性 MYL2 遺伝子関連心筋症の報告を行った (Int Heart J. 2021 Mar 30;62(2):445-447)。本症例から MYL2 蛋白において C 末端が重要な役割を担っていることが確認された。また、右室低形成を伴った RCM 症例では、MYH7 の Converter/Lever 領域の変異を認めた。MYH7 の変異は様々なタイプの心筋症を発症するが、Converter/Lever 領域の変異は小児期発症の RCM に多く認められている変異であり、今後変異と表現型の解析が有用である可能性が示唆された。

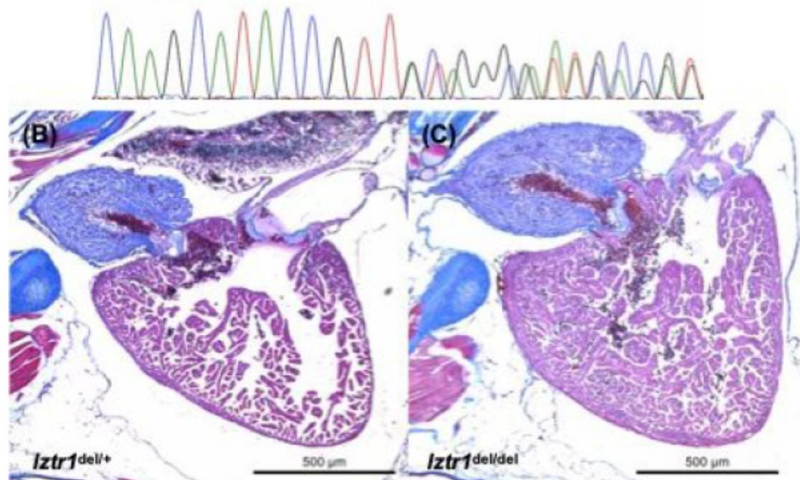


LZTR 1 機能解析:

Iztr1 ノックアウトゼブラフィッシュにおいて、常染色体劣性遺伝ヌーナン症候群において報告されている肥大型心筋症の心臓表現型の再現に成功し、Iztr1 ノックアウトゼブラフィッシュの心臓および血管表現型に関して論文報告を行った (Mol Genet Genomic Med. 2020 Mar;8(3):e1107)。

Danio rerio, Iztr1 exon 2

CGCTAGCAAGCATA**CCGTTGTGGC**ATACAGGGATGCCATATATGCTTTGGAGGAGACAATGG Wild-type
CGCTAGCAAGCATA**CCGTT**-----ACAGGGATGCCATATATGCTTTGGAGGAGACAATGG 7 bp del



また、血管内皮 HUVEC を使った tube formation assay では RNA 阻害により、血管管腔構造の維持が阻害されることを示し、LZTR1 が血管内皮が管腔構造を形成する過程に必須なタンパクであることが示唆された。プルダウンアッセイにおける二次元電気泳動の結果から、空ベクターと過剰発現ベクターとで、異なるスポットが何点か認められ、質量分析法による蛋白同定を試みたが、LZTR1 の機能発現への関与が疑われる蛋白は同定されなかった。

疾患関連変異の機能解析を効率化するために、iPS 細胞を用いた疾患モデリング・解析を得意とする学内外研究者との連携構築を進めた。小児期から成人早期に発症し心筋症表現型の促進を認めた 2 種の疾患関連変異 (RAF1, PTPN11) について、共同研究者らとともに疾患 iPS 細胞を試みた。健常 iPS への標的遺伝子破壊、疾患関連変異導入のための gRNA、ssODN 配列の決定後、エレクトロポレーションの条件最適化、限界希釈によるシングルセル化により、1 系統において目的変異導入クローンの選別に成功した。現在、心筋特異的な細胞周期制御因子を同定するために、変異 RAF1、変異 SHP2 タンパク質のパートナータンパク質及び下流リン酸化シグナルの歪みについて、生化学的に探索を進めている。また上記分子背景の一般化可能性を多系統並列的に検証するために、isogenic control を用いる手法と並行して、患者よりダイレクトに疾患 iPS 細胞を樹立し健常対照株と比較するアプローチについても、共同研究者らとの連携により準備を進めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mori H, Kogaki S, Ishida H, Yoshikawa T, Shindo T, Inuzuka R, Furutani Y, Ishido M, Nakanishi T.	4. 巻 25;86(12)
2. 論文標題 Outcomes of Restrictive Cardiomyopathy in Japanese Children - A Retrospective Cohort Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Circ J	6. 最初と最後の頁 1943-1949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-21-0706	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 Ogawa Y, Urata S, Inuzuka R.	4. 巻 -
2. 論文標題 Successful use of ivabradine in a 10-year-old patient with graft failure after heart transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cardiol Young .	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) 10.1017/S1047951122002335	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 Mori H, Yoshikawa T, Kimura H, Ono H, Kato H, Ono Y, Nii M, Shindo T, Inuzuka R, Horigome H, Miura M, Ogawa S, Shiono J, Furutani Y, Ishido M, Nakanishi T	4. 巻 86
2. 論文標題 Outcomes of Dilated Cardiomyopathy in Japanese Children - A Retrospective Cohort Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circ J.	6. 最初と最後の頁 109-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00380-021-01989-7	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 Mori H, Yoshikawa T, Kimura H, Ono H, Kato H, Ono Y, Nii M, Shindo T, Inuzuka R, Horigome H, Miura M, Hirono K, Kobayashi T, Kogaki S, Furutani Y, Nakanishi T	4. 巻 -
2. 論文標題 Outcomes of hypertrophic cardiomyopathy in Japanese children: a retrospective cohort study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heart Vessels	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) 10.1007/s00380-021-01989-7	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 Tamamitsu AM, Nakagama Y, Domoto Y, Yoshida K, Ogawa S, Hirono K, Shindo T, Ogawa Y, Nakano K, Asakai H, Hirata Y, Matsui H, Inuzuka R	4. 巻 62(2)
2. 論文標題 Poor Myocardial Compaction in a Patient with Recessive MYL2 Myopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int Heart J	6. 最初と最後の頁 445-447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.20-639	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 Nogimori Yoshitsugu, Sato Kaname, Takamizawa Koichi, Ogawa Yosuke, Tanaka Yu, Shiraga Kazuhiro, Masuda Hitomi, Matsui Hikoro, Kato Motohiro, Daimon Masao, Fujiu Katsuhito, Inuzuka Ryo	4. 巻 406
2. 論文標題 Prediction of adverse cardiovascular events in children using artificial intelligence-based electrocardiogram	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 132019 ~ 132019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijcard.2024.132019	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 0件)

1. 発表者名 小川 陽介, 佐藤 要, 大森 紹玄, 田中 優, 白神 一博, 益田 瞳, 松井 彦郎, 柴田 深雪, 平田 康隆, 犬塚 亮
2. 発表標題 LVAD管理中の右心機能からみたBiVADの必要性の考察
3. 学会等名 第58回日本小児循環器学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青木 拓史, 村澤 孝秀, 島峰 逸朗, 八反丸 善裕, 久保 仁, 土井 研人, 犬塚 亮, 浜崎 敬文
2. 発表標題 小児心移植後の抗体関連型拒絶反応に対する血漿交換の経験
3. 学会等名 第43回 日本アフェレシス学会
4. 発表年 2022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	松井 彦郎 (Matsui Hikoro) (40796819)	東京大学・医学部附属病院・准教授 (12601)	
研究 分担者	中釜 悠 (Nakagama Yu) (60846880)	大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授 (24402)	

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