

令和 6 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15910

研究課題名（和文）Noonan症候群のPTPN11変異による心筋肥大の分子機序の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism of myocardial hypertrophy caused by PTPN11 mutation in Noonan's syndrome

研究代表者

石崎 怜奈（Ishizaki, Reina）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：70528299

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：Noonan症候群の一部では二次性心筋症を生じるがその発症機序は不明である。Noonan症候群の疾患関連遺伝子であるPTPN11遺伝子において心筋症発症が無い変異型X、自験例である二次性心筋症症例の変異型Yに着目し、アデノウイルスベクターを用いてX、Yおよび野生型を、ラット新生仔心筋細胞(NRCM)初代培養に過剰発現させ、細胞レベルで比較した。2種の変異型を発現させたNRCMではサルコメア構築の乱れを認め、変異型Yを発現させたNRCMでは心筋細胞面積の低下と生存細胞数の減少を認めた。以上より、PTPN11遺伝子変異YはNRCMの細胞構築の維持と細胞の生存に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Noonan症候群は、1000-2500人に1人の割合で発症する常染色体優性遺伝病である。80%に心血管疾患を合併し、そのうち約20%に心筋肥大を示す二次性心筋症を認める。二次性心筋症については、疾患関連遺伝子変異のうちRAF1変異で重症例が多く認められる一方、PTPN11変異では頻度は低く、重症度も様々である。本研究では、遺伝子型表現型相関について解析が進んでいるRAF1変異例と比較して未解明な点の多いPTPN11変異例において、二次性心筋症が発症する分子メカニズムを解明することにより、二次性心筋症の重症化の機序を明らかにし、疾患特異的治療の一助にする事を目的とした。

研究成果の概要（英文）：It remains to be elucidated the mechanism how secondary cardiomyopathy develops in some cases of Noonan syndrome. We focused on two mutants in the Noonan syndrome causative gene, PTPN11, the mutant X, which has not been reported to cause cardiomyopathy, and the mutant Y, which was detected in our case with secondary cardiomyopathy. cDNAs of the mutant X and Y, and wild type human PTPN11 were overexpressed in neonatal rat cardiomyocytes (NRCM) using adenoviral vectors and the phenotypes of NRCMs were compared at the cellular level. NRCM overexpressing two mutants showed disrupted sarcomere architecture. And NRCMs overexpressing Y exhibited downregulation of cell size and also decreased survival numbers. These results suggest that the mutant Y of human PTPN11 might contribute to the maintenance of cell architecture and cell survival in NRCM.

研究分野：心臓発生

キーワード：Noonan症候群 肥大型心筋症 PTPN11

1. 研究開始当初の背景

Noonan 症候群は常染色体優性遺伝病で、生産児 1000～2500 人に 1 人の発症率である (El Bouchikhi et al., 2016)。Noonan 症候群と診断された患者の遺伝子スクリーニングでは、85% に PTPN11, SOS1, RAF1, KRAS, NRAS, RIT1 等の遺伝子変異を認め、PTPN11 遺伝子変異が最も多い。これらは RAS-MAPK 経路に関わる分子をコードする遺伝子であり、この経路の恒常的活性化が Noonan 症候群の主病因と考えられる。Noonan 症候群の 80% に心血管疾患が合併し、肺動脈狭窄症が最も多いが、肥大型心筋症を特徴とする二次性心筋症も約 20% の症例に認められる (Moak & Kaski, 2012)。遺伝子変異の種類により心疾患の発症率は異なり、RAF1 変異では 61% で二次性心筋症を発症する一方、PTPN11 変異例においては、約 60% に肺動脈狭窄を認め、二次性心筋症は 8.5% と報告されている (Ella and Cristina, 2018)。

小児の肥大型心筋症のうち、先天異常症候群に伴う左室心筋肥大は 10% 以下であるが、その大部分を Noonan 症候群が占めるといわれている (Calcagni et al., 2017)。小児の肥大型心筋症において Noonan 症候群 74 例と特発性もしくは家族性肥大型心筋症 792 例を比較した研究では、Noonan 症候群における二次性心筋症の方が有意に死亡率が高く、中央値が 4.6 か月と早い月齢で心不全を伴って診断されることが多かった (Wilkinson et al. 2012)。一方、Noonan 症候群の二次性心筋症 16 例の長期的検討では、重症例は 14 か月以内に診断される一方で、9 例の中等症の二次性心筋症で進行したのは 1 例のみであった (Colquitt and Noonan, 2014)。重症度に差が生じる理由の一つとして、遺伝子変異による影響が推測された。日本小児循環器学会・心血管疾患の遺伝子疫学委員会の協力を得ておこなった私たちの先行研究において、Noonan 症候群 138 症例を集積したところ、二次性心筋症を伴う症例で遺伝子解析がおこなわれた例では、RAF1 変異が 6 例、PTPN11 変異が 7 例であった。RAF1 変異例と PTPN11 変異例の両者で二次性心筋症の臨床表現型を比較したところ、RAF1 変異例では全例内服治療が行われていたのに対し、PTPN11 変異例では、内服治療が行われていたのは 7 例中 3 例 (43%) であった。また、検査データの比較検討では、RAF1 変異例で心筋が全周性に肥大していたのに対し、PTPN11 変異例の心筋肥大は心室中隔に限局し、重症度に差が認められた (図 1: 2013 年日本小児心筋疾患学会、日本小児循環器学会で一部報告)。以上より、同じ Noonan 症候群で、同様に RAS-MAPK 経路の遺伝子異常でありながら、PTPN11 変異例では RAF1 変異例と異なる心筋肥大様式を示し、二次性心筋症が軽症となる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

Noonan 症候群における PTPN11 変異症例の心筋肥大のメカニズムを解明し、その成果によって二次性心筋症の予後改善に貢献する。

3. 研究の方法

心筋症発症例がほぼ無い既報の PTPN11 遺伝子変異 X、自験例である二次性心筋症症例の PTPN11 遺伝子変異 Y および野生型 PTPN11 遺伝子を、アデノウイルスベクターを用いてラット新生仔心筋細胞 (NRCM) に過剰発現させ、細胞レベルで表現型を比較検討した。

ファロイジン染色及び、心筋特異的マーカーである アクチニン染色で心筋構築を確認し、ImageJ を用いて細胞面積を測定した。

4. 研究成果

2 種の変異型を発現させた NRCM ではサルコメア構築の乱れを認めていた (図 1)。

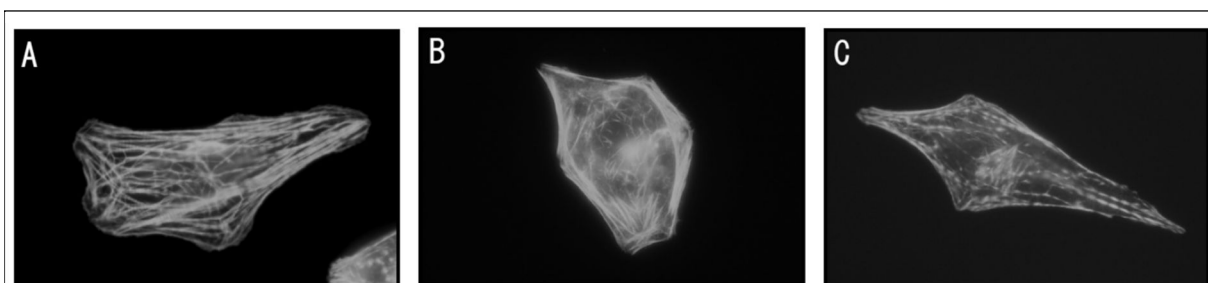


図 1: PTPN11 野生型(A)と変異型 X(B), Y(C)をアデノウイルスベクターにより過剰発現させた NRCM のサルコメア構築 ファロイジン染色により、野生型(A)では規則正しいサルコメア構造が見られるが、遺伝子変異を導入した NRCM(B,C)ではサルコメア構築が乱れていた。

また、変異型 Y を発現させた NRCM では心筋細胞面積の低下と生存細胞数の減少を認めた。(図 2, 3)



図2 : PTPN11 野生型(A)、変異型 X(B)、Y(C)をアデノウイルスベクターにより過剰発現させた NRCM の生存細胞 A、B と比較し、C では生存細胞が減少している。

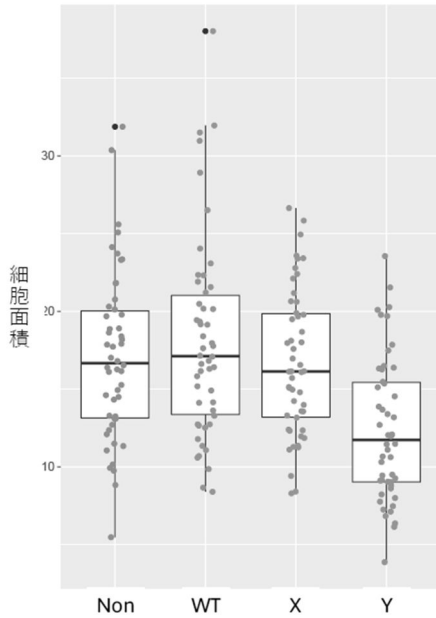


図3 : 遺伝子変異を導入していない Non と、PTPN11 野生型(WT)、変異型 X、Y をアデノウイルスベクターにより過剰発現させた NRCM の細胞面積の比較 Y において、細胞面積が減少している。

以上より、PTPN11 遺伝子変異 X ならびに Y はともに、心筋細胞内のサルコメア構築に影響すること、遺伝子変異 Y は特異的に心筋細胞の生存と細胞のサイズの維持に寄与する可能性が示唆された。

今後は、実験に必要なウイルス量を確保したのちに、PTPN11 遺伝子変異 X および Y の心筋細胞への影響、特に、共通する表現型であるサルコメア構築の変化と遺伝子変異 Y に特異的な表現型である細胞の生存と細胞のサイズについて再現性を確認し、さらに PTPN11 変異により肥大型心筋症を引き起こす下流シグナルの候補因子の活性を検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------