

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659630

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いた拡張型心筋症の遺伝子解析

研究課題名(英文)Genetic Analysis in Dilated cardiomyopathy by deep sequencing

研究代表者

平 将生(TAIRA, Masaki)

大阪大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90624651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：拡張型心筋症は左室あるいは左右の両心室の心筋収縮の低下とその内腔の拡大を特徴とする疾患である。高次遺伝子解析技術により、遺伝的素因以外に、未だ原因が不明な拡張型心筋症の発症メカニズムの解明につながるデータを収集すると共に、拡張型心筋症に対する新たな治療法・創薬ターゲットの開発につながる候補因子の同定を行った。

研究成果の概要(英文)：Dilated cardiomyopathy is characterized by substantial locus, allelic, and clinical heterogeneity. We identified several genes as therapeutic targets in Dilated cardiomyopathy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：拡張型心筋症 ゲノム解析

## 1. 研究開始当初の背景

循環器領域において、高齢化、虚血性心疾患の増加にともない、今後、心不全患者数の増大及びそれに伴う治療費の増加が予想され、既に高額化した医療費の高騰にさらに拍車をかけるものと思われる。重症心不全に対する現在の最終的な治療法は、補助人工心臓や、心臓移植などの置換型治療であり、これまでその有用性が報告されてきたが、現段階では前者はその耐久性や合併症など、後者はドナーの確保や免疫抑制剤の使用等に問題があり、普遍的な治療とは言い難いのが現状である。最近、このような重症心不全に対し、これまでの置換型治療から、遺伝子工学や細胞組織工学、再生医療等を駆使した再生型治療が新しい治療法として注目されている。

拡張型心筋症 (DCM : dilated cardiomyopathy) は左室あるいは左右の両心室の心筋収縮の低下とその内腔の拡大を特徴とする疾患である。症状は、通常心不全に基づく症状や所見があり、しばしば進行性である。不整脈、血栓塞栓症、突然死の合併が高頻度に見られる。長期的には予後不良である。病因は、特発性、家族性(遺伝性)、ウイルス感染症、遺伝的素因、免疫異常、全身性疾患、代謝性疾患、高血圧・アルコール・薬剤・妊娠・中毒など複数の病因が考えられている。本症の病理所見(組織の顕微鏡所見のこと)は非特異的である。肥大型心筋症と異なり、家族性発症の頻度は高くなく。遺伝的な要素は少ないと考えられている。家族性拡張型心筋症は米国で 20%、日本で 25%と報告されている。家族性拡張型心筋症の約 10-25%がメンデルの方式に従うが、残りの大部分は家族歴がないか、家族性でもメンデルの方式に従わない孤発性である。遺伝的素因以外で重要と考えられている病因の一つがウイルス性心筋炎であるが、一方で、原因が不明な症例も数多く存在する。

拡張型心筋症の原因解明に関するこれまでの研究は、遺伝的背景を中心に、心筋の構造タンパクの異常など、疾患から類推できる原因因子の遺伝子異常を探っていく、いわゆるボトムアップ式の原因解明方法であった。しかし近年の遺伝子解析技術の目覚ましい進歩、特に次世代シーケンサーの登場により、ヒトの全ゲノムの解析はもちろんの事、非コード RNA 解析やメチル化など、多方面からの解析データを収集し病因を解明していく、トップダウン方式の疾患解明が可能となっている。

次世代シーケンサーを用いた疾患原因解明は、ガン、認知症、糖尿病などの分野では先行しており、新規の疾患原因や創薬ターゲットも発見されている。この手法を、拡張型

心筋症に応用することで、未だ原因不明の拡張型心筋症の新規治療法の開発や創薬開発が加速されることが期待される。大阪大学は、国内でも有数の心臓移植経験を有し、拡張型心筋症の長年の治療経験から、豊富な疾患データを蓄積している。これらの疾患データと新しいシーケンス技術を融合することで拡張型心筋症治療の画期的なブレイクスルーが生まれることが期待されている。

近年、重症心不全患者に対する心機能回復戦略として、細胞移植法が有用であることが報告されており、すでに自己骨格筋芽細胞による臨床応用が欧米で開始されている (Hagege AA, et al. *Circulation* 114:1108-1113, 2006)。我々も、自己骨格筋芽細胞と骨髄単核球細胞移植を併用すると、単独より心機能改善効果が高いことを証明し (Memon IA, et al *J Thorac Cardiovasc Surg* 130(3):646-653, 2005)。我々は 50 例近い心臓移植と 200 例を超える補助人工心臓治療を経験している。しかし、多数の重症心不全患者を目の前に置換型治療の限界と再生型治療の必要性を痛感し、自己骨格筋由来の筋芽細胞シートによる心筋再生治療法を開発した。本治療法は、補助人工心臓装着の重症拡張型心筋症に対して、補助人工心臓の離脱成功例を世界で初めて報告している。さらに 20 例以上の臨床例の経験から細胞シート移植技術を確立し、企業治験が開始され橋渡し研究を成功させるまでに至っている。

## 2. 研究の目的

高次遺伝子解析技術を駆使することで、未だ原因が不明な拡張型心筋症の発症メカニズムを解明すると共に、拡張型心筋症に対する新たな治療法・創薬ターゲットの開発に展開する。特に、これまで我々が開発を進めてきた拡張型心筋症に対する自己骨格筋筋芽細胞シート移植の治療メカニズムに関連性が示唆される遺伝子解析を行い、拡張型心筋症の新たな治療ターゲットを明らかにすることを旨とする。

## 3. 研究の方法

これまでの拡張型心筋症に対して実施してきた自己骨格筋筋芽細胞シート移植の治療メカニズムから、拡張型心筋症の治療ターゲットを明らかにするために、骨格筋筋芽細胞に発現する遺伝子解析を行った。遺伝子解析方法は、骨格筋芽細胞 (HSMM) と比較対象として間葉系幹細胞 (MSC) との cDNA ライブラリーについて、シグナルシーケンスストラップ法 (SSTREX 法) を実施した。

### (1) cDNA ライブラリーの作製

培養した細胞から Total RNA を抽出し、定法にて増幅 RNA (srRNA) を得た。得られた全

での sRNA をもとに cDNA を作製した。得られた cDNA 断片を pMX-SST ベクターに連結し、cDNA ライブラリーを作製した。

(2) SSTREX 法の実施

cDNA ライブラリーを PLAT-E に導入し、ウイルス液を回収した。得られたウイルス液をマウスプロ B 細胞培養液に添加し培養した。細胞から抽出したゲノム DNA を鋳型にして PCR 産物を得た。塩基配列を解析し、遺伝子発現リストを作成した。

4. 研究成果

(1) cDNA ライブラリーの作製

作製した cDNA ライブラリーの平均インサート長ならびに力価はそれぞれ平均インサート長 1.0 kbp 以上、力価  $1 \times 10^6$  以上であった。

(2) SSTREX 法の実施

SSTREX 法で得られたクローンに含まれるインサートを同定した結果、HSMH は 58 種類、MSC は 65 種類の因子を同定した。

(3) データベースによる遺伝子配列情報の収集と設計

抽出した因子について下記のサイトを用いて遺伝子発現解析用プライマーを設計した。  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

(4) プライマーの合成

脱塩レベルの合成品を得た。

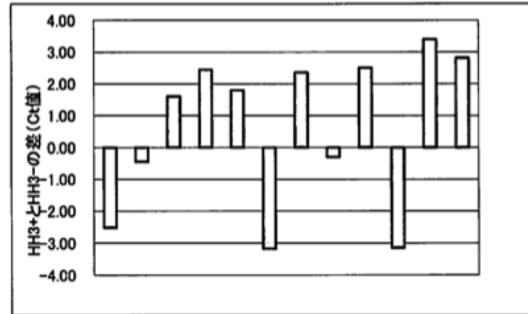
(5) 得られた遺伝子の解析

HSMH は 58 種類、MSC は 65 種類の因子中、HSMH のみが 27 因子を同定した。同定した因子中で 12 因子は分泌蛋白質、15 因子は膜蛋白質であった。

分泌蛋白質 12 因子について比較を行った。Ct 値の差で 1 未満、差がないと考えられるものは 2 因子だった。Ct 値で  $\pm 3$  を超える因子が 3 因子あった。これらは明確に差があると考えられるので詳細な検討を行い、差を確かめる必要があると考える (表 1、図 1)。

(表 1 分泌蛋白質の遺伝子解析)

|      | HH3+  | HH3-  | 差(Ct値) |
|------|-------|-------|--------|
| 因子01 | 17.81 | 20.33 | -2.52  |
| 因子02 | 22.64 | 23.08 | -0.44  |
| 因子03 | 22.77 | 21.17 | 1.61   |
| 因子04 | 17.46 | 15.01 | 2.45   |
| 因子05 | 22.93 | 21.12 | 1.80   |
| 因子06 | 17.42 | 20.59 | -3.18  |
| 因子07 | 18.73 | 16.37 | 2.37   |
| 因子08 | 21.79 | 22.08 | -0.30  |
| 因子09 | 23.28 | 20.78 | 2.51   |
| 因子10 | 21.48 | 24.62 | -3.14  |
| 因子11 | 21.18 | 17.78 | 3.41   |
| 因子12 | 17.70 | 14.88 | 2.82   |

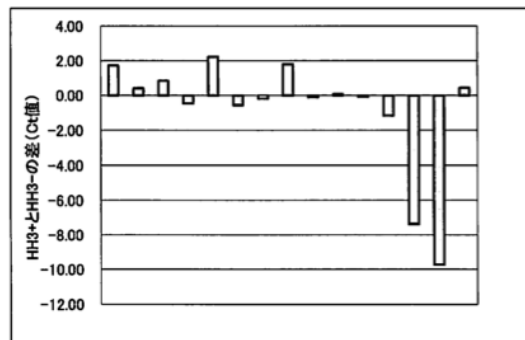


(図 1 分泌蛋白質の解析結果)

膜蛋白質 15 因子について比較を行った。12 因子が Ct 値差で  $\pm 2$  以下だった。分泌蛋白質を含めて差の大きいものは因子 25、因子 26 だった。因子 25 は Ct 値が約 8、因子 26 は Ct 値が約 10 異なった (図 2)。

(表 2 膜蛋白質の遺伝子解析)

|      | HH3+  | HH3-  | 差(Ct値) |
|------|-------|-------|--------|
| 因子13 | 21.86 | 20.11 | 1.75   |
| 因子14 | 28.17 | 27.75 | 0.42   |
| 因子15 | 22.16 | 21.30 | 0.86   |
| 因子16 | 26.14 | 26.61 | -0.47  |
| 因子17 | 24.69 | 22.45 | 2.24   |
| 因子18 | 23.05 | 23.61 | -0.56  |
| 因子19 | 26.75 | 26.92 | -0.17  |
| 因子20 | 20.97 | 19.16 | 1.81   |
| 因子21 | 21.09 | 21.18 | -0.09  |
| 因子22 | 21.97 | 21.88 | 0.09   |
| 因子23 | 25.22 | 25.29 | -0.07  |
| 因子24 | 21.32 | 22.47 | -1.15  |
| 因子25 | 24.99 | 32.36 | -7.36  |
| 因子26 | 22.92 | 32.64 | -9.72  |
| 因子27 | 27.37 | 26.92 | 0.45   |



(図 2 膜蛋白質の解析結果)

これらの結果から、筋芽細胞に特異的に発現している因子と心筋細胞とのインターラク

ションを検討することで、拡張形心筋症に対する筋芽細胞シート移植の治療メカニズムとの関連が明らかになる可能性が示唆される。よって、拡張型心筋症の治療ターゲットとなる可能性のある候補因子が同定された。引き続き、筋芽細胞シート移植が治療効果を示した群に対して、次世代シーケンサー等を用いて一塩基多型や非コードRNAのデータ等の収集をすすめる予定である。さらに、エピジェネティックな変化を調べる方法としても、次世代シーケンサーは非常に有効な手段となる。そして、抽出された疾患原因候補については、サンプル数を拡大し詳細な解析を実施し、解析の精度を上げることで、疾患原因候補を明らかにできることが可能であろう。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

1. 平将生、成人用補助人工心臓の小児重症心不全患者に対する使用とその問題点、第48回日本小児循環器学会総会・学術集会、2012年7月5日 国立京都国際会館

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

平 将生 (TAIRA, Masaki)  
大阪大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：90624651

##### (2) 研究分担者

西 宏之 (NISHI, Hiroyuki)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：00529208

吉川 泰司 (YOSHIKAWA, Yasushi)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：40570594

福嶋 五月 (FUKUSHIMA, Satsuki)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：80596867

齋藤 充弘 (SAITO, Atsuhiko)  
大阪大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：20448038