様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月　 ７ 日現在

機関番号： ３２６１２
研究種目： 若手研究(B)
研究期間： 2014～2015
課題番号： ２６８６０５８４

研究課題名（和文） 次世代シークエンサーを用いた肥大型心筋症の原因遺伝子探索

研究課題名（英文） Genetic analysis of patients with hypertrophic cardiomyopathy using next generation sequencer

研究代表者
谷本　陽子（Tanimoto, Yoko）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：５０３９８６１６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：肥大型心筋症データベースを用いて当大学付属病院を訪れるHCM患者の症例に対し、書面にて説明し同意を得た後に、DNAサンプルを収集した。それらに対し次世代シークエンサーにて塩基配列を決定し、Sanger法により変異の確認を行った。 さらに標準的なiPS細胞作製法に基づき樹立したiPS細胞について、肥大型心筋症由来iPS細胞ラインおよび健常人由来iPS細胞ライン、それぞれの大量培養系に移行した。

研究成果の概要（英文）：From the database consisted of HCM patients visiting Keio University Hospital, DNA samples were collected after obtaining written infromed consent. The DNAs were analyzed by the next generation sequencer. The identified variant was also confirmed by Sanger method. Furthermore, the iPS cells delived from these patients were established by the standard iPS cell preparation method. Each cell lines: healthy human derived iPS cell line and HCM derived iPS cells were shifted to mass culture system.

研究分野： 循環器内科

キーワード： 肥大型心筋症　遺伝子解析　次世代シークエンサー

１．研究開始当初の背景

心臓突然死を来す循環器疾患のうち、心筋症は心室の肥大や拡大から機械的あるいは電気的異常を伴うもので多くは遺伝的要因が関与する。代表的なものは肥大型心筋症、拡張型心筋症、不整脈原性右室心筋症であるが、その中で最も頻度の多いものは肥大型心筋症である。しかし同一家系内でも患者ごとに表現型が異なる例が存在し、拡張相に移行する肥大型心筋症は難治性の心不全を呈しその予後は不良であるがその発生機序は十分に検討されていない。これらの心筋症患者の表現型の違いを次世代シークエンサーによる網羅的遺伝子解析にて探索し、分子生物学的背景を明らかにすることを目的とした。

肥大型心筋症(HCM)は、臨床において比較的良く遭遇する心疾患である。HCM の患者群の中には、若年発症、家族内集積をきたす家族性のものから、孤発例も数多く存在する。申請者は以前当院患者において心エコー図検査において HCM と診断された例を抽出し HCM のデータベースを構築した。本データベースは HCM 患者計 434 例を含み、内訳は心尖部 HCM273 例、閉塞性 HCM18 例、拡張相 HCM18 例、他の HCM161 例と大規模なものである。また、日本人に多い心尖部 HCM は、弧発例が多いが、申請者は心尖部 HCM において高齢、BNP 高値、左房拡大が心房細動発生のリスクとなり、脳梗塞の発症に関連することを報告した。（European Society of Cardiology 2012, 第 77 回日本循環器学会学術集会）家族性 HCM においては、これまでに心筋線維/サルコメアを構成するタンパク質をコードするタンパクを中心に病因遺伝子異常が同定されてきている。1990 年に初めて心筋βミオシン重鎖遺伝子の異常が病因である家系が示された。その後の研究により、HCM の病因として 16 種類以上の遺伝子（タイチン、心筋βミオシン重鎖、心室型ミオシン調節軽鎖、心室型ミオシン必須軽鎖、心筋ミオシン結合蛋白 C、心筋トロポニン T、心筋トロポニン I、αトロポミオシン、心筋αアクチン、テレトニン、筋 LIM 蛋白、ミオゼニン 2、ジャンクトフィリン 2、フォスフォランバンなど）に 900 種類以上の変異が報告されており、家族性 HCM の約 50 から 60%の家系にこれらの変異を認めるとされている。しかしながら、HCM の原因遺伝子は多数あり解析はしばしば困難である。我々は 2013 年から次世代シークエンサーを用いて HCM の網羅的遺伝子解析を開始した。HCM は発症年齢、肥大の部位、程度、重症度、予後などの臨床像は多様である。拡張相 HCM に移行し予後不良である例や、予後良好とされる心尖部 HCM を呈する例もあるが、遺伝子変異との関連は十分明らかではない。HCM に関連する遺伝子異常はなお未知の部分が多く、その病態の解明が急務である。

２．研究の目的

本研究は特に拡張相に移行する HCM の分子生物学的背景を次世代シークエンサーによる網羅的遺伝子解析にて探索し、発症予測因子を同定することを目的とした。

３．研究の方法

(1) サンプル収集

肥大型心筋症データベースを用いて当大学付属病院を訪れる大多数の HCM 患者の症例に対し、書面にて説明し同意を得た。拡張相 HCM は可能な限り全例サンプルを収集し、それ以外の HCM に関しても同意が得られた患者より末梢血 20ml を採取し、リンパ球よりゲノム DNA を抽出した。

(2) 次世代シークエンサーによる DNA シークエンシング

サンプル収集を行った症例の DNA を次世代シークエンサーにて塩基配列を決定した。

(3) Sanger 法による変異の確認

次世代シークエンサーで検出された HCM に関与することが疑われる遺伝子変化に関して、その領域を特異的に増幅するプライマーを設計し PCR、DNA シークエンスにて塩基配列を確認した。

４．研究成果

肥大型心筋症データベースを用いて当大学付属病院を訪れる大多数の HCM 患者の症例に対し、書面にて説明し同意を得た。拡張相 HCM は 可能な限り全例サンプルを収集し、それ以外の HCM に関しても同意が得られた患者より末梢血 20ml を採取し、リンパ球よりゲノム DNA を 抽出した。サンプル収集を行った症例の DNA を次世代シークエンサーにて塩基配列を決定し、Sanger 法により変異の確認を行った。 さらに標準的な iPS 細胞作製法に基づき樹立した iPS 細胞について、免疫染色、RT-PCR、奇形腫形成等などを行い、十分な幹細胞性質を 獲得している細胞株を同定した。これを凍結保存した後、健常人由来 iPS 細胞ライン、肥大型心筋症由来 iPS 細胞ラインを選別し、それぞれ大量培養系に移行した。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 14 件）全て査読有

1. Kimura T, Igarashi A, Ikeda S, Nakajima K, Kashimura S, Kunitomi A, Katsumata Y, Nishiyama T, Nishiyama N, Fukumoto K, Tanimoto Y, Aizawa Y, Fukuda K, Takatsuki S. A cost-utility analysis for catheter ablation of atrial fibrillation in combination with warfarin and dabigatran based on the CHADS2 score in Japan. J Cardiol. 2016 Feb 29. pii: S0914-5087(16)00019-8. doi: 10.1016/j.jjcc.2016.01.008.

2. Kimura T, Takatsuki S, Miyoshi S, Takahashi M, Ogawa E, Nakajima K, Kashimura S, Katsumata Y, Nishiyama T, Nishiyama N, Tanimoto Y, Aizawa Y, Arai T, Fukuda K. Electrical superior vena cava isolation using photodynamic therapy in a canine model. Europace. 2016 Feb;18(2):294-300. doi: 10.1093/europace/euv016.
3. Nishiyama T, Nishiyama A, Negishi M, Kashimura S, Katsumata Y, Kimura T, Nishiyama N, Tanimoto Y, Aizawa Y, Mitamura H, Fukuda K, Takatsuki S. Diagnostic Accuracy of Commercially Available Automated External Defibrillators. J Am Heart Assoc. 2015 Dec 1;4(12). pii: e002465. doi: 10.1161/JAHA.115.002465.
4. Aizawa Y, Negishi M, Kashimura S, Nakajima K, Kunitomi A, Katsumata Y, Nishiyama T, Kimura T, Nishiyama N, Fukumoto K, Tanimoto Y, Kohsaka S, Takatsuki S, Fukuda K. Predictive factors of lead failure in patients implanted with cardiac devices. Int J Cardiol. 2015 Nov 15;199:277-81. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.07.055.
5. Kimura T, Takatsuki S, Miyoshi S, Takahashi M, Ogawa E, Katsumata Y, Nishiyama T, Nishiyama N, Tanimoto Y, Aizawa Y, Arai T, Fukuda K. Optimal conditions for cardiac catheter ablation using photodynamic therapy. Europace. 2015 Aug;17(8):1309-15. doi: 10.1093/europace/euu335.
6. Kimura T, Kohno T, Nakajima K, Kashimura S, Katsumata Y, Nishiyama T, Nishiyama N, Tanimoto Y, Aizawa Y, Fukuda K, Takatsuki S. Effect of Nocturnal Intermittent Hypoxia on Left Atrial Appendage Flow Velocity in Atrial Fibrillation. Can J Cardiol. 2015 Jul;31(7):846-52. doi: 10.1016/j.cjca.2014.12.032.
7. Nishiyama T, Katsumata Y, Inagawa K, Kimura T, Nishiyama N, Fukumoto K, Tanimoto Y, Aizawa Y, Tanimoto K, Fukuda K, Takatsuki S. Visualization of the left atrial appendage by phased-array intracardiac echocardiography from the pulmonary artery in patients with atrial fibrillation. Europace. 2015 Apr;17(4):546-51. doi: 10.1093/europace/euu383.
8. Aizawa Y, Kunitomi A, Nakajima K, Kashimura S, Katsumata Y, Nishiyama T, Kimura T, Nishiyama N, Tanimoto Y, Kohsaka S, Takatsuki S, Fukuda K. Risk factors for early replacement of cardiovascular implantable electronic devices. Int J Cardiol. 2015 Jan 15;178:99-101. doi: 10.1016/j.ijcard.2014.10.157.
9. Kimura T, Takatsuki S, Oishi A, Negishi M, Kashimura S, Katsumata Y, Nishiyama T, Nishiyama N, Tanimoto Y, Aizawa Y, Fukuda K. Operator-blinded contact force monitoring during pulmonary vein isolation using conventional and steerable sheaths. Int J Cardiol. 2014 Dec 20;177(3):970-6. doi: 10.1016/j.ijcard.2014.09.189.
10. Kimura T, Takatsuki S, Miyoshi S, Katsumata Y, Nishiyama T, Nishiyama N, Tanimoto Y, Aizawa Y, Jinzaki M, Fukuda K. Pericardial endoscopy-guided left atrial appendage ligation: a pilot study in a canine model. Circ Cardiovasc Interv. 2014 Dec;7(6):844-50. doi: 10.1161/CIRCINTERVENTIONS.114.001610.
11. Aizawa Y, Takatsuki S, Kashimura S, Katsumata Y, Nishiyama T, Kimura T, Nishiyama N, Tanimoto Y, Tanimoto K, Fukuda Y, Sato T, Ogawa S, Fukuda K. Thoracic impedance as a therapeutic marker of acute decompensated heart failure. Int J Cardiol. 2014 Jul 1;174(3):840-2. doi: 10.1016/j.ijcard.2014.04.159.
12. Kimura T, Takatsuki S, Inagawa K, Katsumata Y, Nishiyama T, Nishiyama N, Fukumoto K, Aizawa Y, Tanimoto Y, Tanimoto K, Fukuda K. Serum inflammation markers predicting successful initial catheter ablation for atrial fibrillation. Heart Lung Circ. 2014 Jul;23(7):636-43. doi: 10.1016/j.hlc.2014.02.003.
13. Kimura T, Takatsuki S, Tanimoto K, Katsumata Y, Nishiyama T, Inagawa K, Nishiyama N, Tanimoto Y, Aizawa Y, Fukuda K. Thrombus formation in the left atrial appendage during catheter ablation for atrial fibrillation under sufficient heparinization. Can J Cardiol. 2014 Apr;30(4):465.e5-6. doi: 10.1016/j.cjca.2014.01.008.
14. Aizawa Y, Takatsuki S, Negishi M, Kashimura S, Katsumata Y, Nishiyama T, Kimura T, Nishiyama N, Tanimoto Y, Tanimoto K, Kohsaka S, Sano M, Fukuda K. Clinical characteristics of atrial fibrillation detected by implanted devices and its association with ICD therapy. Int J Cardiol. 2014 Apr 1;172(3):e529-30. doi:

10.1016/j.ijcard.2014.01.067.

〔学会発表〕（計１件）

1. Yoshiyasu Aizawa, Yoko Tanimoto, Mitsushige Murata, Mai Kimura, Yoshinori Katsumata, Takahiko Nishiyama, Takehiro Kimura, Nobuhiro Nishiyama, Kotaro Fukumoto, Shinsuke Yuasa, Takashi Kohno, Shun Kohsaka, Shinji Makino, Motoaki Sano, Seiji Takatsuki, Keiichi Fukuda. Clinical Characteristics, and Long-term Outcome of the Dilated Phase of Hypertrophic Cardiomyopathy. 第80回日本循環器学会学術集会(国際学会). 2016年03月18日～2016年03月20日国際センター展示棟(宮城県仙台市).

〔図書〕（計０件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計０件）

○取得状況（計０件）

〔その他〕

該当なし

６．研究組織

(1)研究代表者

谷本陽子（Yoko Tanimoto）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50398616

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし