

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月 3日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590808

研究課題名（和文） 肥大型及び拡張型心筋症の網羅的遺伝子解析によるテーラーメイド治療の確立

研究課題名（英文） Research of the tailor-made treatment of hypertrophic and dilated cardiomyopathy by comprehensive genetic analysis

研究代表者

藤野 陽 (FUJINO NOBORU)

金沢大学・保健学系・准教授

研究者番号：40361993

研究成果の概要（和文）：157名のサルコメア遺伝子変異保因者を検出し、そのうち107名について心エコー図検査指標を経時的解析した。7年間の観察期間中、12名に左室収縮不全が認められた。対象をミオシン結合蛋白C遺伝子保因者（MYBPC3群）と非ミオシン結合蛋白C遺伝子保因者（non-MYBPC3群）とに分けて Kaplan-Meier 法で解析した所、non-MYBPC3群はMYBPC3群と比較して、より高頻度に左室収縮不全をきたすことが判明した。

研究成果の概要（英文）：The study included 157 sarcomere gene mutation carriers, and 107 subjects underwent serial echocardiograms. At a mean follow-up of 7 years, 12 subjects experienced systolic dysfunction. When the subjects were divided into MYBPC3 and non-MYBPC3 mutation carriers, the rate of systolic dysfunction was higher in the non-MYBPC3 group than in MYBPC3 group.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：心筋症

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：肥大型心筋症、収縮不全、拡張型心筋症、遺伝子、遺伝学、循環器・高血圧

1. 研究開始当初の背景

肥大型心筋症は、幼小児期より心臓突然死を発症する特発性心疾患であり、若年者の突然死の原因として最も頻度が高い。従って、その早期発見は突然死を予防する上で重要な課題である。1990年に肥大型心筋症の原因

遺伝子：心筋ベータミオシン重鎖遺伝子を世界に先駆けて報告したハーバード大学医学部遺伝学部門サイドマン研究室をはじめとして、世界中で肥大型心筋症の原因遺伝子が検索され、心筋サルコメア構成蛋白をコードする10種以上の遺伝子の変異が病因として報告されてきた。申請者らも心筋トロポニン

I 遺伝子変異による肥大型心筋症の大家系を見出し、その臨床像を世界で初めて明らかにした。また心筋トロポニンT遺伝子変異による肥大型心筋症は、中年以降に収縮不全をきたして拡張型心筋症と類似の病態をとり、心不全に陥りやすいことが判明した。これらサルコメア遺伝子変異が肥大型心筋症患者の約60%の原因であると報告されているが、残り40%の肥大型心筋症患者では原因が不明である。それらの患者家系における遺伝子変異保因者の早期発見、早期治療のために、新たな原因遺伝子検索が急務の課題である。また、拡張型心筋症は重症心不全をきたす特発性心疾患であり、予後不良である。進行例は心臓移植の適応となるが、国内で心臓移植を受けられる機会は未だ少なく、早期診断、治療が重要な課題である。近年、サルコメア遺伝子変異を導入したマウスでは、心筋内カルシウム調節蛋白である心筋リアノジン受容体蛋白や、カルシクエストリン蛋白発現に異常があることが報告されており、この結果、カルシウム関連遺伝子の変異が肥大型心筋症の原因となることが判明した。2003年にはカルシウム関連蛋白の一つであるフォスフォランパンの遺伝子変異(Arg9CysとLeu39Stop)が、それぞれ拡張型心筋症の原因となることが報告された。申請者の施設では、2003年の時点で360の肥大型心筋症家系、及び130の拡張型心筋症家系を把握していた。上記の知見をふまえ、申請者は平成16年度若手研究(B)に研究課題「肥大型、及び拡張型心筋症におけるフォスフォランパン、FKBP12.6遺伝子解析」を申請し、認められた(若手研究(B)、2004~2006年度)。研究成果として、新たに関連の認められない肥大型心筋症患者(発端者)20名、拡張型心筋症患者(発端者)10名を検出し、総計肥大型心筋症380家系、拡張型心筋症140家系を同定した。これら合計520家系における遺伝子検索の結果、肥大型心筋症2家系にフォスフォランパン遺伝子変異:Ile38ThrとIle45Valを、拡張型心筋症1家系にフォスフォランパン遺伝子変異:Arg14 delを検出した。次に、研究課題「肥大型及び拡張型心筋症の病態解明:分子遺伝学的、臨床機能解析的、両アプローチから」が認められた(基盤研究(C)、2007~2009年度)。この研究では、心筋トロポニンIおよびT遺伝子変異保因者が運動誘発性の心筋収縮不全をきたすことを心臓核医学検査により証明し、これが将来の収縮不全、そして心不全進行につながることを明らかにした。

以上の知見を基にして、肥大型及び拡張型心筋症の網羅的遺伝子解析により、個々の患者の遺伝子型に応じたテーラーメイド治療の確立が必要であると着想するに至り、研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究においては、集積した肥大型心筋症400家系、拡張型心筋症148家系について、(1)網羅的な遺伝子解析を進めるとともに包括的な臨床病態を解明し、個々の患者に最適な治療法を確立すること(テーラーメイド治療)、(2)既知遺伝子の変異が検出されなかった家系にて、新規の遺伝子の変異を検出すること、を目指した。

3. 研究の方法

研究の方法として、(1)肥大型及び拡張型心筋症において網羅的に既知の遺伝子変異を検索し、多数の心筋症例において遺伝子型と臨床病型との関連を明らかにすること、(2)さらに、既知の遺伝子の変異が検出されなかった症例では、未知の原因遺伝子の変異を検出すること、を中心として進めた。

(1)対象とする肥大型及び拡張型心筋症については、既に集積した症例に加えてさらに症例集積を継続した。症例集積にあたり、画像診断に苦慮する症例については、研究分担者の山岸に画像解析を依頼した。遺伝子解析の概要は以下のとおりである。白血球よりDNA extractor 341 Nucleic Acid Purification System (GENEPURE, PE Biosystems Corporation Ltd., Foster City, California)を用いてDNAを抽出し、PCR(polymerase chain reaction)法にて遺伝子の増幅を行った。その後は、既に施行してきたSingle Strand Conformation Polymorphism(SSCP)法に替えて、高分解融解曲線分析(Hi-Res Melting: HR-1)を用いてヘテロデュプレックスと野生型の融解曲線のわずかな違いを検出することにより、変異の有無を確認した。専用のガラスキャピラリーでPCRを行い、このガラスキャピラリーをHR-1の装置に入れるだけで、ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動を行うことなく解析は可能であった(所要時間は、1検体当たり2~3分)。このようにして遺伝子変異が検出された心筋症患者において、不整脈の出現や収縮不全の合併などの、患者の予後に関連する臨床病型を追跡調査した。心筋症患者の不整脈関連遺伝子の解析は、研究分担者の林が施行した。

(2)遺伝子変異が検出されない家系については、サテライトマーカを用いた連鎖解析を施行して原因遺伝子の遺伝子座を決定した上で、候補遺伝子アプローチにて検索を行った。

4. 研究成果

2010年度は、遺伝子解析にて遺伝子変異を認められた心筋症家系について、詳細に臨床病態を分析した(雑誌論文⑥、Int Heart J. 51: 214-217, 2010)。その結果、たとえ同じ遺伝子変異により心筋症を発症した症例においても、長期的な臨床病態が異なることが判明した。具体的には、心筋トロポニンI遺伝子であるLys183del変異を有する肥大型心筋症2例の長期経過と病理所見を比較した。一方の74歳女性は、長期経過において次第に左室収縮機能が低下し、74歳の死亡時の病理所見では、心室中隔の菲薄化および心室中隔を中心としたびまん性かつ貫壁性の心筋線維化が認められた。他方の92歳の男性は心筋梗塞を発症するまでは左室収縮機能を保ち、病理解剖時にも非対称性中隔肥厚を示し、典型的な肥大型心筋症の病態を呈していた。このような同一遺伝子変異保因者における臨床病態の差異を生ずる原因として、レニンアンジオテンシン系の多型が関与する可能性を考え、その解析に取り組んだ(雑誌論文⑤、Circ J. 74: 2674-2680, 2010)。具体的には、サルコメア遺伝子変異により肥大型心筋症を発症した遺伝子変異保因者(49家系中の126名、男性64名、平均年齢51歳)において、網羅的にレニンアンジオテンシン系の多型を解析した。その結果、レニンアンジオテンシン系多型のうち、ACE多型のD alleleおよびAT1受容体多型-1166のC alleleを有する遺伝子変異保因者において、左室の拡大や左室の収縮機能低下が認められやすいことが判明した。以上の結果より、サルコメア遺伝子変異が検出された肥大型心筋症においてレニンアンジオテンシン系多型を網羅的に解析することにより、左室収縮機能低下を示しやすい保因者を早期に発見・治療することが可能となり、心筋症患者の予後改善に寄与できる可能性を示した。

2011年度から2012年度にかけては、67の独立した肥大型心筋症家系において、157名のサルコメア遺伝子変異保因者を検出した(雑誌論文①、男性87名、平均年齢46.5±20.5歳)。157名中、心エコー図検査による経時的観察が可能であった107名について、心エコー図検査指標を経時的解析した。平均観察期間は7年で、107名中12名に観察期間中に左室駆出率が50%未満となる左室収縮不全が認められた。多変量解析の結果、収縮不全の出現は、加齢および観察開始時の左室駆出率低値と関連することが判明した(それぞれ、 $P<0.001$ と $P=0.020$)。また原因遺伝子としては、ミオシン結合蛋白C遺伝子(MYBPC3)変異を有する変異保因者では、左室収縮不全が認められにくいことが判明した($P=0.042$)。この結果より、107名の対象をミオシン結合蛋白C遺伝子保因者

(MYBPC3群)と非ミオシン結合蛋白C遺伝子保因者(non-MYBPC3群、すなわち心筋ベータミ

オシン重鎖遺伝子変異保因者、心筋トロポニンT遺伝子変異保因者、および心筋トロポニンI遺伝子変異保因者)に分けて、心エコー図検査指標と生存曲線を比較した。MYBPC3群では経過観察期間中、左室収縮機能に変化は認められなかったのに対して、non-MYBPC3群では左室収縮不全の進行が認められた(下記、Figure 1)。

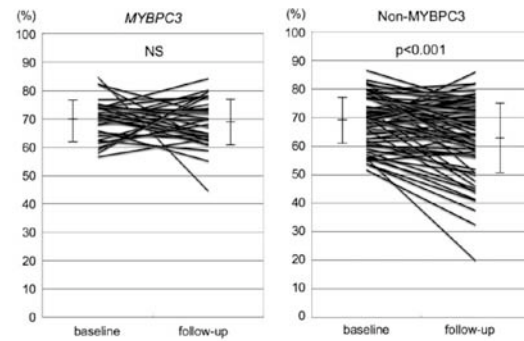


Figure 1. The percent decrease in ejection fraction in MYBPC3 and non-MYBPC3 groups. MYBPC3, myosin-binding protein C gene; NS, not significant.

また Kaplan-Meier 法での解析により、non-MYBPC3群では MYBPC3群と比較して高頻度に左室収縮不全が認められることが判明した(log-rank test、 $P=0.010$ 、Figure 2)。

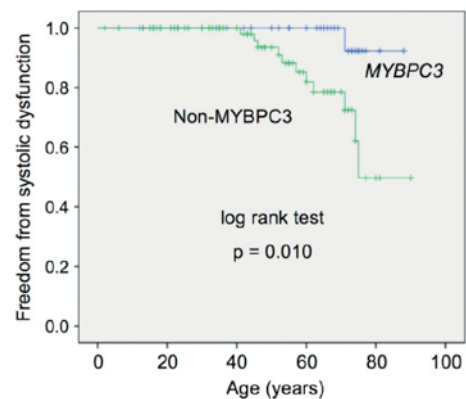


Figure 2. Kaplan-Meier analysis comparing the age at which systolic dysfunction developed in subjects in the myosin-binding protein C (MYBPC3) gene and non-MYBPC3 groups.

左室収縮不全が認められた12名中、11名は平均8.3年の観察期間中に死亡した。

以上より、non-MYBPC3群のサルコメア遺伝子変異保因者は、MYBPC3群のサルコメア遺伝子変異保因者と比較して、より高頻度に左室収縮不全をきたすことが判明した。従って、non-MYBPC3群のサルコメア遺伝子変異保因者については特に、左室収縮不全の出現に注意して加療を続けるべきであると結論づけた。

総括すると、肥大型心筋症患者においてはまず、遺伝子解析により MYBPC 群か non-MYBPC 群かを判別し、その上でレニンアンジオテンシン系の多型も解析することにより、将来の左室収縮不全の出現の可能性を予測出来る

ことが判明した。これらの結果をふまえて薬物治療ならびに非薬物治療を行うことにより、肥大型心筋症の個々の患者に対するテーラーメイド治療の確立に寄与出来ると考えられた。

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 9 件)

- ① Fujino N, Konno T, Hayashi K, Hodatsu A, Fujita T, Tsuda T, Nagata Y, Kawashiri MA, Ino H, Yamagishi M. Impact of systolic dysfunction in genotyped hypertrophic cardiomyopathy. Clin Cardiol, 査読有, 36, 2013, 160-165 DOI: 10.1002/clc.22082.
- ② Liu L, Hayashi K, Kaneda T, Ino H, Fujino N, Uchiyama K, Konno T, Tsuda T, Kawashiri MA, Ueda K, Higashikata T, Shuai W, Kupersmidt S, Higashida H, Yamagishi M. A novel mutation in the transmembrane nonpore region of the KCNH2 gene causes severe clinical manifestations of long QT syndrome. Heart Rhythm, 査読有, 10, 2013, 61-67 DOI: 10.1016/j.hrthm.2012.09.053.
- ③ Demura M, Wang F, Yoneda T, Karashima S, Mori S, Oe M, Kometsani M, Sawamura T, Cheng Y, Maeda Y, Namiki M, Ino H, Fujino N, Uchiyama K, Tsubokawa T, Yamagishi M, Nakamura Y, Ono K, Sasano H, Demura Y, Takeda Y. Multiple noncoding exons 1 of nuclear receptors NR4A family (nerve growth factor-induced clone B, Nur-related factor 1 and neuron-derived orphan receptor 1) and NR5A1 (steroidogenic factor 1) in human cardiovascular and adrenal tissues. J Hypertens, 査読有, 29, 2011, 1185-1195 DOI: 10.1097/HJH.0b013e32834626bb.
- ④ Hayashi K, Fujino N, Ino H, Uchiyama K, Sakata K, Konno T, Masuta E, Funada A, Sakamoto Y, Tsubokawa T, Hodatsu A, Yasuda T, Kanaya H, Kim MY, Kupersmidt S, Higashida H, Yamagishi M. A KCR1 variant implicated in susceptibility to the long QT syndrome. J Mol Cell Cardiol, 査読有, 50, 2011, 50-57 DOI: 10.1016/j.yjmcc.2010.10.007.
- ⑤ Funada A, Konno T, Fujino N, Muramoto A, Hayashi K, Tsubokawa T, Sakata K, Kawashiri MA, Takeda Y, Ino H, Yamagishi M. Impact of renin-angiotensin system polymorphisms on development of systolic dysfunction in hypertrophic

cardiomyopathy. Evidence from a study of genotyped patients. Circ J, 査読有, 74, 2010, 2674-2680

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20975235>

- ⑥ Funada A, Masuta E, Fujino N, Hayashi K, Ino H, Kita Y, Ikeda H, Fujii T, Nakanuma Y, Yamagishi M. Heterogeneity of clinical manifestation of hypertrophic cardiomyopathy caused by deletion of lysine 183 in cardiac troponin I gene. Int Heart J, 査読有, 51, 2010, 214-217 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20558914>

[学会発表] (計 5 件)

- ① 藤野 陽. 原因遺伝子変異が確認された肥大型心筋症の心肥大発症年齢, 第16回日本心不全学会学術集会, 2012年11月30日, 仙台国際センター (宮城県)
- ② 藤野 陽. 肥大型心筋症における心肥大発症に關与する遺伝的要因の検討 (パネルディスカッション8: 心血管疾患発症進展における遺伝・環境的要因), 第60回日本心臓病学会学術集会, 2012年9月16日, 石川県立音楽堂 (石川県)
- ③ Fujino N. Impact of Genetic Analysis on the mode of Death in Genotyped Hypertrophic Cardiomyopathy, American Heart Association's Scientific Sessions 2011, 2011. 11. 15, Orange County Convention Center (USA)
- ④ Fujino N. The Impact of Systolic Dysfunction on Prognosis of Genotyped Hypertrophic Cardiomyopathy, 60th Annual Scientific Session of American College of Cardiology, 2011. 4. 3, Earnest N. Morial Convention Center (USA)

[その他]

ホームページ等

http://intmed2.w3.kanazawa-u.ac.jp/index_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤野 陽 (FUJINO NOBORU)
金沢大学・保健学系・准教授
研究者番号: 40361993

(2) 研究分担者

林 研至 (HAYASHI KENSHI)
金沢大学・大学病院・助教
研究者番号: 00422642

山岸 正和 (YAMAGISHI MASAKAZU)
金沢大学・医学系・教授

研究者番号 : 70393238

(3)連携研究者
なし