

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460742

研究課題名(和文)肥大型心筋症全例登録による発症と予後に関する要因および治療法解明に関する研究

研究課題名(英文) Research of the factors to contribute to the onset and the prognosis of hypertrophic cardiomyopathy by the registration study

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：研究期間中、77例の肥大型心筋症を登録した。臨床的に肥大型心筋症を発症した5例および非発症者2例を含む大家系において、次世代シーケンス(全エクソームシーケンス)を施行した。全エクソームシーケンスにより、60020の稀な塩基変異を検出した。それらの塩基変異について遺伝子型-臨床病型連関を解析することにより、疾患と関連のない塩基変異を除外することができ、最終的に13の候補塩基変異(遺伝子変異)を抽出できた。さらにCADD scoreとHHE遺伝子データを使用することにより、本家系における肥大型心筋症の病因は、ミオシン必須軽鎖遺伝子のp.Arg94Hisミスセンス変異であるとの結論に至った。

研究成果の概要(英文)： We could register 77 cases of hypertrophic cardiomyopathy (HCM). Whole exome sequencing (WES) was performed on seven relatives from a large HCM family with a clear HCM phenotype (five clinically affected and two unaffected) in our registry study. WES detected 60020 rare variants in the large HCM family. After genotype-phenotype matching, 13 putative variants remained. Using combined annotation dependent depletion (CADD) score and high heart expression (HHE) gene data, the number of candidates was reduced to one, a variant in the myosin essential light chain, p.Arg94His.

研究分野：心筋症

キーワード：肥大型心筋症 遺伝子解析 不整脈 突然死 心不全 収縮不全 次世代シーケンス 倫理

1. 研究開始当初の背景

(1) 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種類以上の遺伝子の変異が病因として報告されてきた。研究代表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、詳細な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を解明した。

(2) 研究発展を目的として、研究代表者は平成12年から平成15年まで、米国ハーバード大学医学部遺伝学部門サイドマン研究室に留学し、カルシウム関連遺伝子変異が肥大型心筋症の原因・修飾因子である可能性を示した。この結果をふまえ、課題「肥大型、及び拡張型心筋症におけるフォスフォランバン、FKBP12.6遺伝子解析」を遂行した（若手研究B、平成16～18年度）。肥大型心筋症と拡張型心筋症の家系において遺伝子解析した結果、肥大型心筋症2家系にフォスフォランバン（Phospholamban: PLN）遺伝子変異：Ile38ThrとIle45Valを、拡張型心筋症1家系にPLN遺伝子変異：Arg14delを検出した。これにより、膜貫通部位の変異は肥大型心筋症を、リン酸化部位近傍の変異は拡張型心筋症を、それぞれ発症することを示した。また刺激伝導系障害を伴う心筋症の原因遺伝子を特定し、変異保因者に対して早期にペースメーカーまたは植込型除細動器（ICD）治療を行うことにより、突然死を予防できる可能性を示した。これらの研究結果は総説にまとめて、国民に広く発信した（特発性心筋症における遺伝子変異と臨床病型との対応 - 心筋症における遺伝子変異臨床病型連関. 藤野 陽ら. 医学のあゆみ 217: 809-813. 2006）。このように、研究代表者は一貫して心筋症の遺伝子解析を進め、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」を遂行した（基盤研究C、平成19～21年度）。結果、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。続いて、課題「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」を遂行した（基盤研究C、平成22～24年度）。本研究では、レニンアンジオテンシン系遺伝子多型と肥大型心筋症収縮不全との関連を示した。さらに157例という多数の遺伝子変異確定肥大型心筋症例において、非ミオシン結合蛋白C遺伝子変異保因者（Non-MYBPC3）では「収縮不全合併の危険性」が高いことを予測できると報告した。また研究分担者である山岸と研究代表者が中心となり平成20年度から開始した多施設共同研究では、1年間の経過観察期間において、サルコメア遺伝子変異保有心肥大患者は高血圧症に伴う心肥大患者と比較して、心不全増悪による入院、および心房細動の出現の項目で心血管イベントの頻度が高いことを示した。課題「心筋症における不整脈関連遺伝子の検索と機能解析および薬物的・非薬物的介入」（基盤研究C、平成25～27年度）では、研究分担者として心筋症における不整脈関連遺伝子を検索した。

(3) これらの研究成果に基づき、研究代表者は、遺伝子変異の有無にかかわらず肥大型心筋症を全例登録し、その発症や心不全増悪による入院・致死性不整脈合併等の予後・心血管イベントに関連する分子遺伝学的・臨床的要因、および最適な治療法を解明することが急務であると考えた。この目的を達成するために、研究課題「肥大型心筋症全例登録による発症と予後に関する要因および治療法解明に関する研究」を立案するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、

(1) 肥大型心筋症例の全例登録を行い遺伝学的および臨床的なパラメーターを記録し、経過追跡により将来の心不全合併予測や致死性不整脈合併予測を可能とすること、

(2) 予測し得た患者について、病態増悪を治療・予防すること、

(3) 次世代シーケンサー使用により、迅速かつ広汎に遺伝子解析を施行しつつ、新規の肥大型心筋症原因遺伝子を検索すること、

を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 平成 26 年度は症例登録開始を目的として、課題「北陸肥大型心筋症登録観察研究」を金沢大学医学倫理審査委員会に申請し、平成 27 年 3 月 18 日付で「条件付き承認」を受けた。平成 27 年度は同倫理審査委員会から提示された条件に対応して、平成 27 年 6 月 3 日に課題が正式に「承認」された。承認後から、肥大型心筋症例の登録を開始した。患者情報に関しては個人情報分担管理者による連結匿名化を行った上で、登録日(西暦/月/日)、診断確定年、年齢(才)、生年・性別(男・女)、登録時の身長と体重、原因遺伝子が確定している場合には原因遺伝子、を記録した。臨床パラメーターとして、心エコー図指標：左房径(mm)、心室中隔厚(mm)、左室後壁厚(mm)、左室拡張末期径(mm)、左室収縮末期径(mm)、左室内径短縮率(%)、左室駆出率(%) (Teichholtz 法または Simpson 法)、左室流出路圧較差(mmHg)、左室流入波形 (E/A)、E/e'、を記録した。その他、血圧、BNP や心筋トロポニンを含めた採血データ、心電図、心不全指標、使用薬剤を記録した。予後・心血管イベントとして、生存/死亡、全入院、心不全による入院、心室細動、ICD の有無および適切・不適切作動の有無、心房細動、心房細動に伴う脳梗塞の有無、について追跡調査を行った。

(2) 次世代シーケンサー使用により、迅速かつ広汎に遺伝子解析を施行し、肥大型心筋症原因遺伝子を探索した。候補遺伝子は、肥大型心筋症の原因遺伝子として確立したサルコメア遺伝子の他、肥大型心筋症と類似の病態を呈する心ファブリー病の原因遺伝子： α -ガラクトシダーゼ遺伝子 (GLA) 等である。

4. 研究成果

(1) 肥大型心筋症例の全例登録を継続しつつ、臨床経過の追跡調査を行った。

具体的には、1) 自覚症状：NYHA、2) 身体所見：収縮期・拡張期血圧・心拍数、3) 臨床検査：BNP (または NT-proBNP)・Hb・総ビリルビン・BUN・クレアチニン・尿酸・Na・K、4) 心エコー：左室拡張末期径・左室収縮末期径・左室駆出率・心室中隔壁厚・左室後壁厚・左房径・左室流出路圧較差・心尖部肥大・僧帽弁逆流、5) 核医学検査 (任意検査)、6) 薬物治療：ACE 阻害薬・ARB・ β 遮断薬・ループ利尿薬・サイアザイド系利尿薬・アルドステロン拮抗薬・ジギタリス・Ca 拮抗薬・I 群抗不整脈薬・アミオダロン・ワーファリン、7) 非薬物治療：PPM・ICD・CRT-P・CRT-D・PTSMA・外科的心筋切除術 (施行時期も)、8) 心血管イベント：(発症から登録時までの期間に生じたイベント)、心不全増悪による入院、心血管疾患による入院、致死性不整脈 (持続性心室頻拍、心室細動)、

ICD 作動、心臓移植、9) 原因遺伝子変異について、登録時に評価した。平成 29 年 3 月 31 日付で、77 例の肥大型心筋症例の登録を終えた。

その後、全死亡、心血管死 (心不全死、突然死、脳卒中死)、非心臓死、心不全増悪による入院、心血管疾患による入院、致死性不整脈 (持続性心室頻拍、心室細動)、ICD 作動、補助人工心臓、心臓移植の施行について、1 年毎の追跡調査を継続した。

追跡調査において、60 代女性がアミオダロン内服に伴う間質性肺炎を発症して入院した。間質性肺炎発症に伴い心不全が増悪し、頻脈性心房細動も併存して心不全コントロールが困難であったため、房室結節アブレーションが施行され、同時に両室ペーシング機能付植込み型除細動器が植え込まれた。以後、心不全はコントロールされ、外来に通院中である。本例は、心筋トロポニン I 遺伝子変異保因者であった。

また、50 代女性が動悸を主訴とした入院中に心室細動を発症して蘇生され、ICD が植え込まれた。本例も、心筋トロポニン I 変異保因者であった。

永続性心房細動を合併してワーファリンコントロールされていた 70 代女性が、脳梗塞を発症した。幸い、入院後に脳血流が再開したため大きな麻痺を残さずに退院できた。本例は、心筋ベータミオシン重鎖遺伝子変異保因者であった。

(2) 並行して、平成 26 年 9 月 30 日付で金沢大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会にて承認された、課題「遺伝性心血管疾患における集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究」の計画書に則り、肥大型心筋症の遺伝子解析を進めた。

臨床的に肥大型心筋症を発症した 5 例および非発症者 2 例を含む大家系において、次世代シーケンス (全エクソームシーケンス) を施行した (下記：図 1 の左の家系 HCM-F18)。

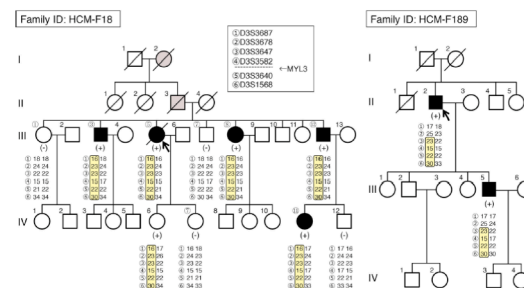


図 1：肥大型心筋症の 2 家系連鎖解析の結果も記載 (雑誌論文 ③ から引用)

全エクソームシーケンスにより、60020 の稀な塩基変異を検出した。それらの塩基変異について遺伝子型-臨床病型連関を解析することにより、疾患と関連のない塩基変異を除

外した。最終的に、13の候補塩基変異（遺伝子変異）を抽出した。さらに CADD score と HFE 遺伝子データを使用することにより、本家系における肥大型心筋症の病因は、ミオシン必須鎖遺伝子の p.Arg94His ミスセンス変異であるとの結論に至った（下記：図2）。

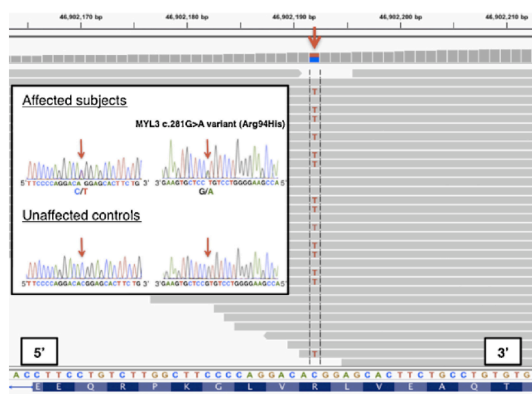


図2：シーケンスの結果
（雑誌論文③から引用）

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12件）

- ① Konno T, Hayashi K, Fujino N, Yamagishi M. Hypokalemia and the Disappearance of Giant Negative T Waves. Intern Med. 査読有, 55, 2016, 545-546. DOI: 10.2169/internalmedicine.55.5770.
- ② Konno T, Nagata Y, Teramoto R, Fujino N, Nomura A, Tada H, Sakata K, Furusho H, Takamura M, Nakamura H, Kawashiri MA, Yamagishi M, Hayashi K. Usefulness of Electrocardiographic Voltage to Determine Myocardial Fibrosis in Hypertrophic Cardiomyopathy. Am J Cardiol. 査読有, 117, 2016, 443-449. DOI: 10.1016/j.amjcard.2015.11.015.
- ③ Nomura A, Tada H, Teramoto R, Konno T, Hodatsu A, Won HH, Kathiresan S, Ino H, Fujino N, Yamagishi M, Hayashi K. Whole exome sequencing combined with integrated variant annotation prediction identifies a causative myosin essential light chain variant in hypertrophic cardiomyopathy. J Cardiol. 査読有, 67, 2016, 133-139. DOI: 10.1016/j.jjcc.2015.09.003.
- ④ Hayashi K, Konno T, Tada H, Tani S, Liu L, Fujino N, Nohara A, Hodatsu A, Tsuda T, Tanaka Y, Kawashiri MA, Ino H, Makita N, Yamagishi M. Functional Characterization of Rare Variants Implicated in Susceptibility to Lone Atrial Fibrillation. Circ Arrhythm Electrophysiol. 査読有, 8, 2015, 1095-1104. DOI: 10.1161/CIRCEP.114.002519.
- ⑤ Konno T, Hayashi K, Fujino N, Oka R, Nomura A, Nagata Y, Hodatsu A, Sakata K, Furusho H, Takamura M, Nakamura H, Kawashiri MA, Yamagishi M. Electrocardiographic QRS Fragmentation as a Marker for Myocardial Fibrosis in Hypertrophic Cardiomyopathy. J Cardiovasc Electrophysiol. 査読有, 26, 2015, 1081-1087. DOI: 10.1111/jce.12742.
- ⑥ Nagata Y, Konno T, Fujino N, Hodatsu A, Nomura A, Hayashi K, Nakamura H, Kawashiri MA, Yamagishi M. Right ventricular hypertrophy is associated with cardiovascular events in hypertrophic cardiomyopathy: evidence from study with magnetic resonance imaging. Can J Cardiol. 査読有, 31, 2015, 702-708. DOI: 10.1016/j.cjca.2014.12.036.
- ⑦ Tada H, Kawashiri MA, Nohara A, Saito R, Tanaka Y, Nomura A, Konno T, Sakata K, Fujino N, Takamura T, Inazu A, Mabuchi H, Yamagishi M, Hayashi K. Whole exome sequencing combined with integrated variant annotation prediction identifies asymptomatic Tangier disease with compound heterozygous mutations in ABCA1 gene. Atherosclerosis. 査読有, 240, 2015, 324-329. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.04.003.
- ⑧ Fujita T, Konno T, Yokawa J, Masuta E, Nagata Y, Fujino N, Funada A, Hodatsu A, Kawashiri MA, Yamagishi M, Hayashi K. Increased extent of myocardial fibrosis in genotyped hypertrophic cardiomyopathy with ventricular tachyarrhythmias. J Cardiol. 査読有, 66, 2015, 63-68. DOI: 10.1016/j.jjcc.2014.10.002.
- ⑨ Nomura A, Konno T, Fujita T, Tanaka Y, Nagata Y, Tsuda T, Hodatsu A, Sakata K, Nakamura H, Kawashiri MA, Fujino N, Yamagishi M, Hayashi K. Fragmented QRS predicts heart failure progression in patients with hypertrophic cardiomyopathy. Circ J. 査読有, 79, 2015, 136-143. DOI: 10.1253/circj.CJ-14-0822.

⑩ Hodatsu A, Konno T, Hayashi K, Funada A, Fujita T, Nagata Y, Fujino N, Kawashiri MA, Yamagishi M. Compound heterozygosity deteriorates phenotypes of hypertrophic cardiomyopathy with founder MYBPC3 mutation: evidence from patients and zebrafish models. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 査読有, 307, 2014, H1594-H1604. DOI: 10.1152/ajpheart.00637.2013.

⑪ Konno T, Hayashi K, Fujino N, Nagata Y, Hodatsu A, Masuta E, Sakata K, Nakamura H, Kawashiri MA, Yamagishi M. High sensitivity of late gadolinium enhancement for predicting microscopic myocardial scarring in biopsied specimens in hypertrophic cardiomyopathy. *PLoS One*. 査読有, 9, 2014, e101465. doi: 10.1371/journal.pone.0101465. eCollection 2014.

⑫ Fujino N, Konno T, Yamagishi M, Hayashi K. Left ventricular apical aneurysm and systolic dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy. *J Cardiol*. 査読無, 64, 2014, 253-255. DOI: 10.1016/j.jjcc.2014.04.009.

[学会発表] (計 3 件)

① Noboru Fujino, Kenshi Hayashi, Kenji Sakata, Tetsuo Konno, Toyonobu Tsuda, Yoji Nagata, Ryota Teramoto, Akihiro Nomura, Yoshihiro Tanaka, Masakazu Yamagishi. Effect of olmesartan alone, and in combination with azelnidipine in the control of hypertension and plasma B-type natriuretic peptide levels. 21st World Congress on Heart Disease (国際学会)、平成 28 年 8 月 1 日、ボストン (アメリカ合衆国)

② Ryota Teramoto, Noboru Fujino, Hayato Tada, Tetsuo Konno, Kenshi Hayashi, Masakazu Yamagishi. Targeted Sequencing Panel Focusing on 21 Cardiomyopathy-associated Genes Efficiently Identifies Disease-causing Variants in Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy. 第 80 回日本循環器学会学術集会 (国際学会)、平成 28 年 3 月 18 日、仙台国際センター (宮城県仙台市)

③ 多田隼人、今野哲雄、林研至、川尻剛照、藤野陽、山岸正和. Current Perspectives in Common and Rare Variant Association Study for Plasma Lipids and Coronary Artery Disease. 第 62 回日本心臓病学会学術集会 (招待講演)、平成 26 年 9 月 27 日、仙台国際センター (宮城県仙台市)

[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

(4) 研究協力者

なし