

# 難治性心疾患の病態形成に関連したゲノム多様性の解明と治療戦略の開発

●木村 彰方

東京医科歯科大学・難治疾患研究所

## <研究の目的と進め方>

心疾患はわが国の3大死因のひとつでありその克服は社会的にも急務であるが、特に心筋梗塞、特発性心筋症、特発性不整脈などの致死性心疾患は、病因ないし病態形成機構が不明なため有効な治療法や予防法が存在しない。そこで本研究では、難治性心疾患について、生体システムの機能構築におけるゲノム要素間の機能連関を指標としたアプローチによって疾患関連遺伝子を同定し、さらに疾患関連遺伝子の機能解析を通じた病態形成機構の解明と治療戦略の開発を目的とする。具体的には、1) 網羅的マイクロサテライト関連解析で特定した心筋梗塞感受性領域内の疾患関連遺伝子多型の同定と機能変化の検討、2) 機能連関を指標にした特発性心筋症および特発性不整脈の新規原因不整脈の同定と機能変化の解明、3) 疾患関連遺伝子多型ないし変異に起因する機能変化を是正する方策の開発を行う。

## <2007年度の研究の当初計画>

### 1. 心筋梗塞感受性遺伝子解析

日本人および韓国人の患者集団、対照集団それぞれから各500件以上の血液サンプル、患者集団については冠動脈造影データおよび心筋梗塞危険因子などの臨床情報を収集している。マイクロサテライトマーカー (MS) を用いた網羅的関連解析で心筋梗塞との関連が確認された6MSを選択したため、これらについて心筋梗塞感受性候補遺伝子の絞り込みを行う。候補遺伝子が絞り込まれた領域については関連解析を実施し、心筋梗塞感受性 SNP を特定する。さらに、心筋梗塞との関連を示す SNP の機能変化を検討する。

### 2. 難治性心筋疾患原因遺伝子の解析

Cypher/ZASP 結合タンパク遺伝子、タイチン I-Z 領域、N2-B 領域、NOVEX 領域、is2 領域などに結合するタンパクの遺伝子群などの候補遺伝子について、拡張型および肥大型心筋症患者における変異を検索する。変異が見出された場合は、当該タンパク間の結合親和性、GFP 融合遺伝子を用いた当該タンパクの細胞内分布変化、細胞形態変化等を検討する。また、難治性不整脈患者集団について既知の原因遺伝子の変異を検索すると同時に、機能連関を指標として選択した候補遺伝子の変異を検索する。

### 3. 疾患変異による機能変化是正

これまでの研究によって心筋収縮の Ca 感受性制御が特発性心筋症の病態形成に深く関与することが判明している。そこでミオシン軽鎖脱リン酸化酵素に着目した Ca 感受性制御法を開発する。

## <2007年度の成果>

### 1. 心筋梗塞感受性遺伝子解析

網羅的 MS 解析で特定した感受性遺伝子座について、周辺 MS 解析、新規 SNP 探索、SNP 関連解析、大規模関連検証を行った。特に、遺伝子 A (仮称) のプロモーター領域 SNP が日本人心筋梗塞と有意に関連することを患者約 500 名—対照約 600 名ならびに患者約 1,000 名—対照約 2,000 名の独立した2つの集団で見出した。さらに韓国人集団についても、患者約 500 名—対照約 700 名の比較で遺伝子 A プロモーター多型との有意な関連を確認し

た。また、心筋梗塞感受性 SNP は遺伝子 A の転写活性が高いこと、当該箇所核タンパクが結合すること、およびその結合性が SNP によって異なることを示した。なお、当該遺伝子 A 多型は欧米人集団、黒人集団各 90 名程度 (HapMap サンプル) には認められず、アジア人に特異的な多型であることが示唆された。一方、LTA, LGALS2, PSMA6 多型と心筋梗塞ないし冠動脈疾患との関連は日本人、韓国人集団いずれでも認められなかった。これに対して 9p21 領域多型との有意な関連は日本人、韓国人ともに確認された。

### 2. 難治性心筋疾患原因遺伝子の解析

家族性心筋症の原因遺伝子として、新たに FHL2 変異、Obscurin 変異、ラミニン  $\alpha$  4 変異およびインテグリンキナーゼ変異を同定し、それぞれの機能変化を解明した。また、高血圧性心筋症と有意に関連する BMP10 多型が Tcap 結合性を減少させ、BMP10 の細胞外分泌を亢進させること、BMP10 は心筋細胞の肥大とサルコメア整合性促進を来すことを解明した。一方、Brugada 症候群に機能不明なサルコレンマ関連遺伝子の変異を同定した。当該タンパクには細胞膜貫通領域に2種類のアイソフォームがあるが、その片方は心筋 Na チャネルと細胞内局在が一致することを明らかにした。さらに、心筋 K チャネルに対する自己抗体が原因となる新たな QT 延長症候群発症機構を見出した。

### 3. 疾患変異による機能変化是正

ミオシン軽鎖脱リン酸化酵素 (PP1M) 抑制サブユニット (M21) を発現するトランスジェニックマウス (M21-TGM) は肥大型心筋症と酷似した病態を呈した。また、M21-TGM では PP1M 活性サブユニット (M110) の Thr696 位のリン酸化が亢進していたため、M21 は M110 の機能抑制を介して心肥大をもたすものと考えられた。また、M21 と M110 との結合ドメインをマッピングした。

## <国内外での成果の位置づけ>

### 1. 心筋梗塞感受性遺伝子解析

欧米人における大規模 GWAS 解析の結果が3研究グループから独立に報告された。それらに共通する 9p21 座位については我々の日本人集団、韓国人集団の解析でも関連が確認されたが、欧米人集団で再現性が確認されなかったと報告された複数の座位については、日本人でも関連を追認できなかった。我々が独自に全ゲノム解析から同定し、大規模関連解析で関連を再確認した感受性遺伝子はそれらのいずれとも異なる。ことに、遺伝子 A のプロモーター多型は欧米人や黒人には認められず、アジア人集団に特異的な心筋梗塞感受性遺伝子であると考えられた。

### 2. 難治性心筋疾患原因遺伝子の解析

心筋症関連原因遺伝子の同定研究では我々は世界のトップに位置づけられており、国内共同研究のみならず国際的な共同研究も展開することによって、新たな病因遺伝子の同定に至っている。難治性不整脈の原因究明については、自己抗体による QT 延長症候群を世界で初めて記載した。また、サルコレンマ関連タンパク変異の同定については世界的に報告がない。

### 3. 疾患変異による機能変化是正

心筋症の病因変異による機能変化を是正する試みは国内外の研

究者らによって行われている。PP1M ラージサブユニットである M130 の高発現マウスが心筋負荷時に拡張型心筋症様の機能障害を呈することが報告されているが、M21 による Ca 感受性制御で肥大型心筋症モデルが作製された報告は我々以外にはない。また、M21-TGM は心肥大のみならず、心筋細胞の錯走配列、突然死、心不全死などヒトの肥大型心筋症の特徴所見を呈する世界で初めてのモデルマウスである。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

網羅的マイクロサテライト解析で明らかになった 6 座位の心筋梗塞関連遺伝子座のうち、原因遺伝子および疾患関連 SNP の同定に至ったのは 2 座位のみである。残る 4 座位についてはマイクロサテライト関連解析で領域の絞り込みを行ったが、当該領域には既知の遺伝子構造がなかったため、さらに範囲を広げたマイクロサテライト多型解析を進めている。1 座位については、当初関連を示したマイクロサテライトから数 100Kb 離れた領域の遺伝子内に有意な関連を認めており、さらなる多型解析が必要である。このことは、マイクロサテライトによる連鎖不平衡領域が想像以上に広いことを示唆する。

特発性心筋症、特発性不整脈の新規原因遺伝子の同定については当初の計画を達成しているが、Brugada 症候群に関連する変異が機能不明な新規遺伝子内に見出されたため、当該遺伝子の機能解明に予想外の時間がかかっている。

M21-TGM が肥大型心筋症の病態を忠実に反映する世界で初めてのマウスモデルであることを証明出来た。このことは我々の研究構想が正しいことを示しているが、M21-M110 の結合ドメインのマッピングに予想外の時間がかかっている。これは M21, M110 の断片を細胞内で十分に発現させることが困難なためと考えられる。さらに、ファージディスプレイ法を用いて M21-M110 間の結合性を修飾するペプチドのスクリーニングを進めたが、特異的なペプチドは得られなかった。これも M21 タンパクを断片化すると安定性が低下することによることが示唆されるため、安定して発現出来る最小領域のマッピングを進めている。

#### <今後の課題>

今後とも難治性心疾患の病因に関連する新たな変異および多型を同定し、その機能変化を解明することで、病態形成機構（経路）を解明する。また、解明された病態経路を修飾することで疾患発症を抑制する戦略を立案する。

#### <成果公表リスト>

##### 1) 論文/プロシーディング (2007 年度発表分)

##### 1.0612191157 (論文)

Kimura A, Takahashi M, Choi B-Y, Bae S-W, Hohta S, Sasaoka T, Nakahara K, Chida K, Sawabe M, Naruse T, Izumi T, Park J-E, Lack of association between LTA and LGALS2 polymorphisms and myocardial infarction in Japanese and Korean populations, *Tissue Antigens*, 69(3): 265-269 (2007)

##### 2. 0704171424 (論文)

Arimura T, Hayashi T, Matsumoto Y, Shibata H, Hiroi S, Nakamura T, Inagaki N, Hinohara K, Takahashi M, Itoh-Satoh M, et al, Structural analysis of four and half LIM protein-2 in dilated cardiomyopathy., *Biochem Biophys Res Commun*, 357(1): 162-167(2007)

##### 3. 0704171433 (論文)

Aizawa Y, Ueda K, Scornik F, Cordeiro JM, Wu Y, Desai M, Guerchicoff A, Pollevick GD, Sicouri S, Sato A, et al, A novel mutation in KCNQ1 associated with a potent dominant negative effect as the basis for the LQT1 form of the long QT

syndrome, *J Cardiovasc Electrophysiol*, 18(9): 972-977(2007)

##### 4. 0801091947 (論文)

Knoell R, Postel R, Wang J, Kraetzner R, Hennecke G, Vacaru AM, Vakeel P, Schubert C, Murthy K, Rana BK, et al., Laminin alpha 4 and integrin-linked kinase mutations cause human cardiomyopathy via simultaneous defects in cardiomyocytes and in endothelial cells., *Circulation*, 116(5):515-525 (2007)

##### 5. 0801092004 (論文)

Arimura T, Matsumoto Y, Okazaki O, Hayashi T, Takahashi M, Inagaki N, Hinohara K, Ashizawa N, Yano K, Kimura A, Structural analysis of obscurin gene in hypertrophic cardiomyopathy, *Biochem Biophys Res Commun*, 362(2): 281-287 (2007)

##### 6. 0801092011 (論文)

Nakamura K, Katayama Y, Kusano KF, Haraoka K, Tani Y, Nagase S, Morita H, Miura D, Fujimoto Y, Furukawa T, et al., Anti-KCNH2 Antibody-induced long QT syndrome -novel acquired form of long QT syndrome-, *J Am Coll Cardiol*, 50(18): 1808-1809 (2007)

##### 7. 0801092037 (論文)

Nakano N, Hori H, Abe M, Shibata H, Arimura T, Sasaoka T, Sawabe M, Chida K, Arai T, Nakahara K, et al., Interaction of BMP10 with Tcap may modulate the course of hypertensive cardiac hypertrophy, *Am J Physiol Heart Card Physiol*, 293(6): H3396-H3403 (2007)

##### 8. 0801092043 (論文)

Shichi D, Matsuzawa Y, Ota M, Katsuyama Y, Matsumori A, Takahashi M, Naruse TK, Inoko H, Kimura A, HLA-DP beta chain may confer the susceptibility to hepatitis C virus-associated hypertrophic cardiomyopathy, *Int J Immunogenet*, 35: 37-43 (2008)

##### 9. 0801092059 (論文)

Hinohara K, Nakajima T, Takahashi M, Hohda S, Sasaoka T, Nakahara K, Chida K, Sawabe M, Arimura T, Sato A, et al., Replication of association between a chromosome 9p21 polymorphism with coronary artery disease in Japanese and Korean populations, *J Hum Genet*, in press

その他、0608021303 (論文)、0704171428 (論文)、0704171437 (論文)、0801091952 (論文)、0801092019 (論文)、0801092054 (論文)の業績がある。

#### 班員間での共同研究

心筋梗塞研究において、マイクロサテライト解析で東海大学猪子英俊教授、コホート解析で三重大学山田芳司教授との共同研究を実施している。