

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659410

研究課題名(和文) 難治性心疾患の新規原因遺伝子の網羅的探索

研究課題名(英文) Exhaustive screening of novel genes responsible for refractory heart diseases

研究代表者

村越 伸行 (Murakoshi, Nobuyuki)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：80447218

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)：ランダム変異マウスに対し、心機能・形態・心臓刺激伝導能を指標に大規模ファワード・ジェネティック・スクリーニングを行った。約6800匹の第一世代スクリーニングを終了し、そのうち41匹について表現型陽性と判定し、それらのうち29匹について第二世代マウスを作成してスクリーニングを行ったところ、心肥大を呈する1系統および心室性不整脈を呈する1系統について遺伝性が確認された。発見された遺伝性不整脈マウスは多形性心室頻拍を呈し、SNPマッピングにより責任遺伝子座が同定された。今後、次世代シーケンシングにより原因遺伝子の特定し、表現型の詳細な解析を加えたのち、新たな遺伝性不整脈マウスモデルとして報告する。

研究成果の概要(英文)：We performed a large-scale forward genetic screening for the random mutated mice library based on the functional, morphological, and electrophysiological parameters to find new model with genetic cardiac disorders. First screening of approximately 6,800 mice have been completed, 41 of them were determined as having positive phenotype, and second generation were produced by crossing between 29 mice of phenotype-positive mice. Among them, 2 strains (1 strain with left ventricular hypertrophy and 1 strain with ventricular arrhythmia) had inheritable characters. We identified a genetic locus responsible for a rhythmic phenotype (polymorphic ventricular tachycardia) using SNP mapping. We will identify the responsible gene using next-generation sequencing, analyze detailed phenotypes, and report a novel model of hereditary arrhythmia near future.

研究分野：循環器内科学

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：分子心臓病態学 心臓病 遺伝 遺伝性不整脈

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、心疾患は悪性新生物に次いで日本における死因の第二位を占めており、特に難治性心疾患の克服は循環器領域における大きな課題である。難治性心疾患の代表的疾患である心筋症のうち、肥大型心筋症は約半数に家族性発症が認められ、これまで 15 以上の原因遺伝子が報告されており、遺伝子変異と病態・予後との関連について少しずつ明らかとなっている。しかし拡張型心筋症や拡張相肥大型心筋症の遺伝的背景については十分に明らかになって。また、家族性を有する場合、伝導障害を合併する例も多いが、その原因は十分解明されていない。心筋症は重症化すると、心不全や突然死を引き起こし、生活の質と生命予後を著しく悪化させ、心移植以外には根本的治療法がないのが現状である。病態の解明と予後の改善のためにはさらなる遺伝的背景の解明と適切なモデル動物を用いた基礎的研究が必要である。

(2) 変異マウスライブラリーは理化学研究所で開始されたプロジェクトの一つで、化学変異原であるエチルニトロウレア(ENU)を使用した大規模かつ体系的な変異マウスライブラリーである。これまで、いくつかの施設で様々な表現型解析が行われ、60 以上の原因遺伝子の同定、注意欠陥多動性障害や変形性関節症など、従来適切なモデル生物のなかったような疾患モデルマウスの確立、および病態の解明に大きく貢献してきた。この変異マウスライブラリーに対して詳細な循環器的スクリーニングは行われておらず、心疾患モデルの確立あるいは心疾患の原因遺伝子の同定についてはこれまでに報告がない。

2. 研究の目的

本研究は、次世代ジーンターゲットシステム(ランダム変異マウスライブラリー)を用いて、心機能・形態・心臓刺激伝導能を指標に大規模かつ網羅的な *in vivo* スクリーニングを行い、遺伝性心筋症や遺伝性伝導障害といった難治性心疾患の原因遺伝子を同定すること、さらには、有用な遺伝性心疾患モデルマウスを確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 変異マウスライブラリーの作成

理化学研究所バイオリソースセンターにてランダム変異マウスライブラリーを作成する。化学変異原であるエチルニトロウレア(ENU)をマウスに投与すると、ゲノム 1 Mb あたり 1 つの点突然変異を誘発し、マウス 1 個体には平均 3,000 個の変異が蓄積する。ENU 投与した雄(G0)を正常野生型雌と交配して得られる第一世代(G1)をスクリーニングに用いる。

(2) マウスの表現型解析

作成された 8 週齢の第一世代(G1)マウスは週 60 匹ずつ理化学研究所バイオリソースセンターから筑波大学生命科学動物資源センターに搬入する。マウスは、全身麻酔下で 12 誘導心電図および心臓超音波による心臓形態評価・心機能評価・電気生理学的評価を行う。心電図を 1 分間記録し、心拍数、PQ 時間、QRS 時間、QTc を小動物用心電図自動解析システムで測定する。心臓超音波は小動物用の Vevo2100 を使用し、傍胸骨左室長軸像および短軸像によって左室径、左房径、短縮率、駆出率、壁厚の計測を行う。最初に野生型マウス(ENU 投与されていないマウス) 100 匹に対して行い、平均値 \pm SD を決定する。次に、ENU 投与第一世代マウスに対してスクリーニングを行う。スクリーニングは年間約 3000 匹ずつ行い、3 年間で計 9000 匹を目標とする。収縮機能障害、心肥大、心臓形態異常(先天性心疾患など)、心室性・上室性不整脈・ブロックなどの伝導障害、を有する個体を陽性と判断する。

(3) 遺伝性心疾患モデルマウスの開発

表現型として心疾患を呈するマウスを野生型マウスと交配し、第二世代(G2)マウスを作成し、再度表現型解析を行う。遺伝性があれば第一世代と同様の表現型を持つ個体が得られるはずであり、それらの表現型陽性個体を心疾患モデルマウスとして樹立する。

(4) 原因遺伝子の同定

第二世代で表現型陽性の雄マウスを別系統のマウスと戻し交配して第三世代(G3)を作成し、DNA を抽出する。全染色体にわたり設置したマーカーを用いて、TaqMan 法による高速 SNPs マッピングを行う。その結果をもとに連鎖解析に基づいて責任遺伝子座を特定する。最終的にはダイレクトシーケンスにて原因遺伝子を同定する。

4. 研究成果

(1) 平成 23 ~ 25 年度に約 6800 匹の第一世代スクリーニングを終了し、そのうち 41 匹について表現型陽性と判定(心肥大 20、左室駆出率低下 7、心肥大 + 左室駆出率低下 11、心拡大 1、心室性不整脈 1、大動脈基部拡大 1) した。図 1 に正常例と心肥大例の心エコー図の典型例を示す。心肥大は心エコーで測定した LV mass (mg) が +3SD を超えていた場合、陽性と判定した(図 2)。第一世代スクリーニングで表現型陽性と判定した 29 匹について第二世代マウスを作成してスクリーニングを行ったところ、心肥大を呈する 1 系統および心室性不整脈を呈する 1 系統について遺伝性が確認された。

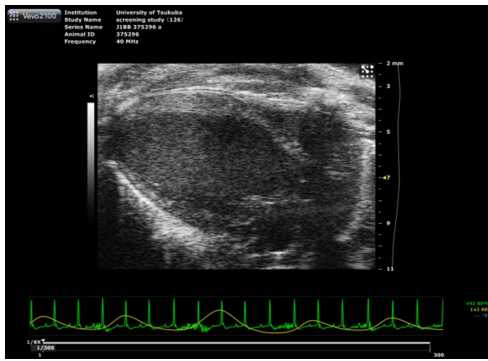
(2) 図 3 に示すように、遺伝性心室性不整脈マウスは心室性期外収縮二段脈や二方向性心室頻拍を呈した。SNP マッピングにより責任遺伝子座が同定された(図 4)。

(3) 表現型陽性マウスおよび表現型陰性マウスから DNA を抽出し、次世代シーケンシングによって原因遺伝子を同定する。

(4) 今後、遺伝性心室性不整脈マウスとしてデータを公表する。

図 1 マウスの心エコースクリーニング

A) 正常例



B) 心肥大 + 心拡大例

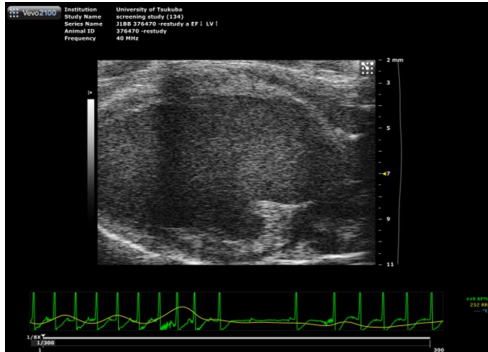


図 2. 一次スクリーニング:

心エコーで計測した LV mass (mg) が +3SD を超える個体を心肥大陽性と判定した。

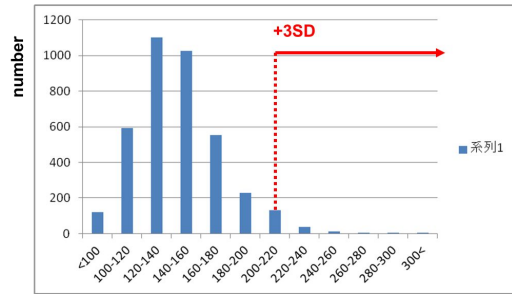
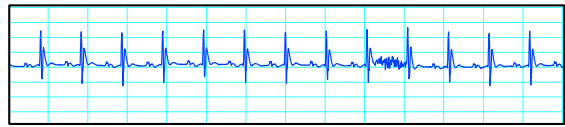
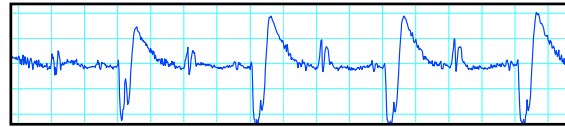


図 3. マウスの心電図スクリーニング

A) 正常例



B) 心室性期外収縮二段脈



C) 二方向性心室頻拍

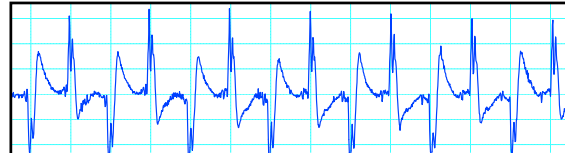
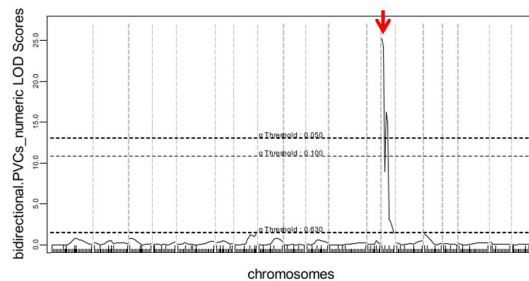


図 4. 責任遺伝子座の同定

Strain Distribution Pattern をもとに QTL(Quantitative Trait Locus)解析を行い、矢印の locus にロッドスコアのピークを認めた。



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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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〕

ホームページ等：未公表

6. 研究組織

(1)研究代表者

村越 伸行 (MURAKOSHI, NOBUYUKI)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：80447218