

難病基盤・応用研究プロジェクト室 終了報告書

プロジェクト名

難病筋疾患の病態解明と治療法の開発に関する研究（難病筋疾患プロジェクト2）

目的

本プロジェクトでは、分子病態分野、遺伝子発現制御学分野、細胞分子医学分野がそれぞれ取り組んで来た横紋筋難病（特発性心筋症および筋ジストロフィー）に関するこれまでの研究成果を基に、3分野が有する研究技術やリソースを駆使して、①遺伝性心疾患患者における遺伝子変異の検索と新規原因遺伝子の解明、②HLA 領域内にマップされるスプライシング制御因子（NFKBIL1）による免疫・炎症制御機序、③動脈硬化性疾患の原因遺伝子 MKL1 による免疫・炎症制御機序、④タイチンスプライシングに着目した心筋症病態解明と治療薬の開発の試み、⑤サルコペニアの発症機序の解明と骨格筋再生療法の開発に関する研究を推進することを目的とする。

構成メンバー

木村彰方、黒柳秀人、大石由美子、林文晴、林晋一郎、安健博、成瀬妙子

研究成果

① 遺伝性心疾患患者における遺伝子変異の検索と新規原因遺伝子の解明

遺伝性心疾患の既知原因遺伝子 67 遺伝子の変異を次世代シーケンス法で探索するシステムを確立し、若年（15 歳以下）で発症した肥大型心筋症患者集団を対象とした病因遺伝子変異の探索を行った。特記すべきことは、若年発症例の約 80%には病因変異が同定出来ること、約 1/3 の症例は de novo 変異であることであった（業績3）。また、特殊な肥大型心筋症病型（mid-ventricular obstruction: MVO）症例の病因変異を探索したところ、通常の肥大型心筋症例とは変異遺伝子の分布が全く異なることであった（業績2）。これとは別に、既知の原因遺伝子には変異が見出されない肥大型心筋症大家系を用いた網羅的連鎖解析を行い、新規の原因遺伝子座を同定した（未発表データ）。一方、心筋収縮のカルシウム感受性を亢進する M21 分子を高発現するトランスジェニックマウス（M21-Tg）を樹立し、これが肥大型心筋症と同様の病態を呈すること、心筋リモデリング関連遺伝子の発現亢進と心筋症病態には乖離があることを明らかにした（業績5、プレスリリース、Bloom 記事）。

② HLA 領域内にマップされるスプライシング制御因子（NFKBIL1）による免疫・炎症制御機序

C型肝炎ウイルス感染に続発する拡張型心筋症の原因遺伝子座が NFKBIL1 遺伝子近傍にマッピングされるが、NFKBIL1 遺伝子がコードする IκB 分子は宿主の免疫関連遺伝子やインフルエンザウイルス遺伝子の選択的スプライシングを制御することが判明している。そこで、IκB 分子による免疫・炎症制御機序を検討したところ、IκB はインターフェロンによって誘導される細胞内 RNA 分解に関わる遺伝子 X の選択的スプライシングを制御し、高活性型アイソフォームを増強することを見出した（未発表データ）。

③ 動脈硬化性疾患の原因遺伝子 MKL1 による免疫・炎症制御機序

網羅的ゲノム解析から冠動脈硬化症の原因遺伝子であることを同定した MKL1 を高発現するトランスジェニックマウス (MKL1-Tg) を樹立し、このマウスにおいてマクロファージの増殖・分化が異常となること及び炎症性腸疾患への発症感受性が亢進することを明らかにした (業績 7、プレスリリース)。現在、このマウスにおける動脈硬化症の進展について解析している。

④ タイチンスプライシングに着目した心筋症病態解明と治療薬の開発の試み

サルコメアタンパク質タイチンをコードする *TTN* 遺伝子は、家族性あるいは孤発性の特発性拡張型心筋症 (DCM) の原因遺伝子として最も高い頻度で変異が見つかり、心筋特異的・発生段階依存的な選択的スプライシングを受ける。*TTN* 遺伝子の選択的スプライシングの制御因子をコードする *RBM20* 遺伝子の変異もまた DCM の原因となる。本プロジェクトでは、日本と米国の DCM 患者集団における *RBM20* 遺伝子変異のスクリーニングを行い、日本の家族性 DCM 患者に R634W ヘテロ接合変異を、米国の孤発性 DCM 患者に G1031X のホモ接合変異を見出した。さらに、DCM 患者でこれまでに報告された *RBM20* 変異が集中する RSRSP 配列の 2 つのセリン残基のリン酸化が *RBM20* の核移行と *Ttn* 遺伝子などのスプライシング制御に必須であることを見出した (業績 4、プレスリリース、報道記事)。また、心筋症等における *RBM20* の役割についての総説を著した (業績 1)。組換えマウス実験室 (現未来ゲノム研究開発支援室) の平岡優一助教らの協力を得て *Rbm20* のノックアウトマウスと拡張型心筋症患者型変異を模したノックインマウスを作製し、生体情報薬理分野の井原健介助教らの協力を得て表現型解析を行っており、ノックインマウスのみが若齢での顕著な心機能低下と左心室内径の拡大、持続性心房細動と心室頻拍、突然死を起こすことを見出している (未発表)。また、*Ttn* 遺伝子の選択的スプライシングパターンを可視化する蛍光レポーター細胞を開発し、タンパク質リン酸化酵素阻害剤を中心に *Ttn* 遺伝子の選択的スプライシングを人為的に操作できる化合物のスクリーニングを行っている。

⑤ サルコペニアの発症機序の解明と骨格筋再生療法の開発

筋ジストロフィーは、筋線維の変性と再生を繰り返しながら次第に筋萎縮が進行する遺伝性の難病である。本研究では、骨格筋の再生・修復を担う骨格筋幹細胞 (筋衛星細胞) に着目し、筋衛星細胞の疲弊 (増殖能の低下) に伴う再生不全が筋萎縮の原因となるとの仮説を検証すべく検討を行った。筋損傷後に活性化された筋衛星細胞は一過性に転写因子 KLF5 を発現すること、KLF5 が筋衛星細胞の機能制御に重要であることを明らかにした (業績 11、特許出願)。さらに、筋再生におけるニッチ因子としてのマクロファージに関する検討もすすめ、時計遺伝子 *Bmal1* がマクロファージの機能制御に重要であることを明らかにした (業績 10)。

発表業績 (プロジェクト参加メンバーに下線)

- 1) Watanabe T, Kimura A, Kuroyanagi H. Alternative splicing regulator RBM20 and cardiomyopathy. Front Mol Biosci, In Press
- 2) Inagaki N, Hayashi T, Takei Y, Tanimoto K, Chikamori T, Kimura A. Clinical and genetic background of hypertrophic cardiomyopathy with midventricular obstruction. J Hum Genet, Sept 11, 2018 Epub (doi: 10.1038/s10038-018-0509-9)
- 3) Hayashi T, Tanimoto K, Yamada K, Tsuda E, Ayusawa M, Nunoda S, Hosaki A, Kimura A. Genetic background of Japanese patients with pediatric hypertrophic and restrictive

cardiomyopathy. J Hum Genet, June 15, 2018 Epub (doi: 10.1038/s10038-018-0479-y)

- 4) Murayama R, Kimura K, Togo-Ohno M, Yamasaki-Kato Y, Naruse TK, Yamamoto T, Hayashi T, Ai T, Vatta M, Iizuka M, Saito M, Wani S, Hiraoka Y, Kimura A, Kuroyanagi H. Phosphorylation of the RSRSP stretch is critical for splicing regulation by RNA-Binding Motif Protein 20 (RBM20) through nuclear localization. Sci Rep 2018; 8: 8970
- 5) Arimura T, Muchir A, Kuwahara M, Morimoto S, Ishikawa T, Nakao S, Machida N, Tanaka R, Yamane Y, Hayashi T, Kimura A. Overexpression of heart-specific small subunit of myosin light chain phosphatase results in heart failure and conduction disturbance. Am J Physiol-Heart Circ Physiol, 2018; 314(6):H1192-H1202
- 6) Harada H, Hayashi T, Nishi H, Kusaba K, Koga Y, Koga Y, Nonaka I,. Phenotypic expression of a novel desmin gene mutation: hypertrophic cardiomyopathy followed by systemic myopathy. J Hum Genet 2018; 63(2): 249-254.
- 7) An J, Nagaishi T, Watanabe T, Naruse TK, Watanabe M, Kimura A. MKL1 expressed in macrophages contributes to the development of murine colitis. Sci Rep. 2017; 7: 13650.
- 8) Oishi Y. and Manabe I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration. International Immunology. 30: 511-528, 2018.
- 9) Oishi Y. and Manabe I. Kruppel -like factors in metabolic homeostasis and cardiometabolic diseases. Frontiers in cardiovascular medicine 2018 doi: 10:3389/fcvm.2018.00069
- 10) Oishi Y, Hayashi S, Isagawa T, Oshima M, Iwama A, Shimba S, Okamura H, Manabe I. Bmal1 regulates inflammatory responses in macrophages by modulating enhancer RNA transcription. Sci Rep 7:7086, 2017.
- 11) Hayashi S, Manabe I, Suzuki Y, Oishi Y. Klf5 regulates muscle differentiation by directly targeting muscle specific genes in cooperation with MyoD in mice. eLife 5:e17462, 2016.

その他（特許、プレスリリース等）

項目①関連

1. プレスリリース

心不全と不整脈を来す心筋症の新たなモデルマウスを作製（2018. 4. 26）

http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20180426_1.pdf

2. Bloom 記事

医療研究 ★最前線 未来医療を拓く（ヒトと同じ心筋症のモデルマウス 心不全の治療開発に新たな可能性）

http://www.tmd.ac.jp/cm/soumu/kouhou/bloom!/vol.25/research_worker27.pdf

3. APSselect April 2018(米国生理学会が発行する 13 のジャーナルに発表された論文の中から、特にインパクトが強いものとして選ばれた論文。2018 年 4 月の APSselect は 8 論文)

<https://www.physiology.org/toc/apsselect/5/4>

項目③関連

1. プレスリリース

1) 炎症性腸疾患発症感受性が高い新たなモデルマウスを樹立 (2017/10/20、日本語)

http://www.tmd.ac.jp/press-release/20171020_1/index.html

2) Role of Transcriptional Co-factor in Inflammation Hints at Possible Inflammatory Bowel Disease Treatment (2017/12/12、英語)

http://www.tmd.ac.jp/english/press-release/20171212_1/index.html

2. 報道記事

1) 特定遺伝子の高発現発見 炎症性腸疾患 症状、マウスで再現 (2017/10/23、日刊工業新聞)

2) 炎症性腸疾患発症に MKL1 遺伝子の発現増強が関与 東京医歯大、新たなモデルマウスを樹立・解析 (2017/10/26、QLifePro 医療ニュース)

項目④関連

1. プレスリリース

1) 拡張型心筋症の原因変異が分子ばねタンパク質の発現に影響するしくみを解明 (2018/6/13、日本語)

http://www.tmd.ac.jp/press-release/20180613_1/index.html

2) Of Hearts and Giants: Moving a Cardiac Regulatory Protein to the Right Place (2018/6/21、英語)

http://www.tmd.ac.jp/english/press-release/20180621_1/index.html

2. 報道記事

1) 日本経済新聞「東京医科歯科大、難治性心臓病 原因遺伝子発見、心筋のばね弱く」(2018/6/12、電子版)

2) 日経産業新聞「遺伝子変異 心筋収縮弱く 拡張型心筋症 マウスで確認」(2018/6/13、朝刊)

3) 日刊工業新聞「拡張型心筋症、たんぱく質の変異起因 東京医科歯科大が発見」(2018/6/13、朝刊)

4) 科学新聞「拡張型心筋症 原因遺伝子変異が引き金 バネタンパク質に発現異常」(2018/6/21)

項目⑤関連

1. 特許

1) 発明の名称：筋サテライト細胞の培養方法

発明者：大石 由美子、林 晋一郎

出願番号（国内）：特願 2017-121787 出願日：2017/06/22

2) 発明の名称：筋サテライト細胞の培養方法

発明者：大石 由美子、林 晋一郎、上住 聡芳

出願番号：PCT/JP2018/ 23629 出願日：2018/06/21