

心筋緻密化障害に関する研究

分担研究者 市田 露子

研究協力者 廣野 恵一

所 属 富山大学大学院医学薬学研究部（医学）小児科学教室

研究要旨

【目的】心筋緻密化障害は、心室壁の過剰な網目状の肉柱形成と深い間隙を特徴とした心筋症で、難治性心不全や突然死の原因となる疾患である。2006 年の AHA 分類でも遺伝的要素の強い primary cardiomyopathy として分類されている。典型例は新生児期に心不全のため死亡し、心移植の対象になっている疾患である。しかし、病態については明らかにされていない。【対象と方法】対象は心筋緻密化障害患者とした。臨床面と基礎研究面の両面から心筋緻密化障害の発症機構の解明するために、まず、心筋緻密化障害の臨床像を検討する。次に、心筋緻密化障害患者において、胎生期における心筋層の発達・成熟に関わる遺伝子異常の探索を行う。さらに、探索された遺伝子異常が心筋の発達・成熟に及ぼす影響を明らかにするために、患者 iPS 細胞由来心筋細胞を作製し、機能解析を行った。【結果】臨床的な検討では、乳児例の大半は心不全を伴っていたが、幼児・学童例は半数が無症状であった。左室駆出率は乳児例で低値であった。左室後壁厚や左室駆出率の Z-score は左室駆出率と相関が見られた。左室後壁厚の Z-score は死亡および心移植のリスクファクターであることが示された。患者から採取した血液からベクターにより遺伝子導入し iPS 細胞を作成し心筋細胞に分化させることができた。【結論】臨床的な検討では、左室壁厚の Z-score は LVNC 患者の予後と相関することが明らかとなった。今後は患者を蓄積した上で、臨床遺伝学的検討を推し進め、iPS 細胞を用いた機能解析による評価をすすめていく予定である。

A. 研究目的

心筋緻密化障害は、心室壁の過剰な網目状の肉柱形成と深い間隙を特徴とした心筋症で、難治性心不全や突然死の原因となる疾患である。2006 年の AHA 分類でも遺伝的要素の強い primary cardiomyopathy として分類されている。典型例は新生児期に心不全のため死亡し、心移植の対象になっている疾患である。

我々は、本邦で初めて心筋緻密化障害の症例を報告し（市田露子、他。日本小児科学会雑誌 1996）、さらに全国調査を行い、その臨床像が心不全、不整脈や塞栓症など極めて多彩であることを報告した（Ichida, et al. Am J Coll Cardiol,

1999）。また、心筋緻密化障害には遺伝的多様性があり、その発症には、Barth 症候群に見られる G4.5 (TAZ) 遺伝子の他（Ichida, et al. Mol Genet Metab, 2002）、Dystrobrevin 遺伝子 (DTNA) 変異（Ichida, et al. Circulation, 2001）、や細胞骨格蛋白関連遺伝子である cypher/ZASP (LDB3) など数多くの遺伝子が関与していることを明らかにした（Ichida, et al. Mol Genet Metab, 2002）。しかしながら、これらの既知の遺伝子異常が認められる例は、10%未満に過ぎず、他の未知の遺伝子が原因となっている可能性が高い（Ichida, Circ J, 2009）。

正常では、胎生期において、心室壁の発達は

2層の心筋細胞層から始まり、続いて心内膜面から肉柱構造が形成されていく。ヒト胎生8週では、両心室が形成され心収縮力が増し、これに応じて肉柱層の緻密化が進む。同時に心外膜側からの冠動脈が発達し、心内膜面からの血液供給に変わって冠血流が主体になっていく。在胎週数とともに緻密層の肥厚が進み、らせん状に配列した心筋の3層構造が完成されていく。

心筋緻密化障害は、胎生初期の心室壁の発達の過程において、スポンジ状の胎児心筋が遺残し、心筋緻密層が低形成になると考えられている (Sedmera D, et al. *Anat Rec*, 2000.)。そして、著明な肉柱形成のために心内膜面や肉柱間隙からの血液供給が障害され、心内膜下の心筋虚血を引き起こし、心機能低下が起こると仮説されている。しかし、現在までこの仮説は実証されていない。

B. 研究方法

臨床面と基礎研究面の両面から心筋緻密化障害の発症機構の解明するために、まず、心筋緻密化障害の臨床像を検討する。次に、心筋緻密化障害患者において、胎生期における心筋層の発達・成熟に関わる遺伝子異常の探索を行う。さらに、探索された遺伝子異常が心筋の発達・成熟に及ぼす影響を明らかにするために、患者iPS細胞由来心筋細胞を作製し、機能解析を行う。具体的には、以下の3項目を行った。

(i) 患者の臨床像の検討

(ii) 患者血液サンプルの採取および遺伝子解析

(iii) 患者血液サンプルからのiPS細胞の樹立およびiPS細胞から心筋細胞への分化誘導と患者iPS細胞由来心筋細胞の分化能および増殖能の評価、電気生理学的機能測定

C. 研究結果

(i) 全国調査と臨床像の検討

小児期発症の心筋症の症例に対し、臨床像と遺伝的背景の有無を把握する。特に、家族性の

有無、他の心筋症の有無、致死的不整脈や突然死の有無について検討を行った。

心奇形を有さない小児LVNC患者205例を乳児例(1歳未満、108例)と幼児・学童例(1歳以上15歳以下、97例)に分け、臨床症状と心臓超音波所見を後方視的に観察研究を行った。左室壁厚と左室拡張期径を体表面積に基づきZ-scoreを算出し、左室駆出率および予後との相関を検討した。

その結果、乳児例の大半は心不全を伴っていたが、幼児・学童例は半数が無症状であった。左室駆出率は乳児例で低値であった。左室後壁厚や左室駆出率のZ-scoreは左室駆出率と相関が見られた。左室後壁厚のZ-scoreは死亡および心移植のリスクファクターであることが示された。

(ii) 患者血液サンプルの採取および遺伝子解析

検体を用いた遺伝子解析はすでに富山大学研究倫理委員会の承認を受けている(受付番号: 遺伝子24-2)。血液検体からDNAを抽出し次世代シーケンサーにて遺伝子異常の有無を検討した。

(iii) 患者血液サンプルからiPS細胞の樹立
採取したサンプルから、レンチウイルスベクターにより細胞のリプログラミングに必要な因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)を遺伝子導入し、iPS細胞を作成した(Warlich, et al. *Molecular Therapy*, 2011)。得られたiPS細胞については機能解析にて未分化性を確認の上、心筋細胞への分化に利用する。まず、全ての株からDNAを抽出しシーケンスを行い、患者に由来するiPS細胞に探索された遺伝子の変異が改変されていないことを確認した。さらに免疫蛍光染色法、リアルタイムPCR等により、樹立した全てのiPS細胞が万能性を示すことを確認した。

iPS細胞から心筋細胞への分化誘導
iPS細胞を、Bone Morphogenetic Protein (BMP) およびその内因性阻害因子であるActivin A、basic Fibroblast growth factor、Wnt賦活剤および

阻害剤を用いて、心筋細胞へと分化誘導を行った (Uosaki, et al. Plos one, 2011)。

D. 考察

心筋緻密化障害 (left ventricular noncompaction)は、発症率は、乳児では10万人に0.81人、小児では10万人に0.12人、成人では0.014%と報告され、稀少疾患に属する。

臨床症状は心不全、不整脈、血栓塞栓症である。突然死は不整脈を有する左室緻密化障害の患者の半数程度に認められる。心不全に対する標準治療では、NYHA分類I~II度においては内服治療や、外科的治療、心臓再同期療法などのデバイスが選択されるが、さらに病状が進行しNYHA分類III~IV度となり、不可逆の状態となった場合には、補助人工心臓、心臓移植が適応となる。

発症の時期は、症例により新生児期~乳児期、学童期~思春期、あるいは成人と発症時期は幅広く、臨床像が多彩である。新生児期・乳児期発症例は、重篤な心不全症状で発症し、10~15年で約半数は心移植の適応あるいは死亡している。さらに重症の胎児心不全、胎児死亡例も報告されている。これに対し、患者家族の検索や、心電図検診などで発見された症例は、無症状で長い間経過し、10~15年では心移植あるいは死亡する症例は1~2割程度である。

心筋緻密化障害の診断には心臓超音波がもっとも有用であり、今までにChin、Jenni、Stöllbergerらが心臓超音波によるLVNCの診断を提言しているが、統一した診断基準はなく、それぞれの診断基準が異なっている。Chinらは、心外膜面から最も深い間隙の底面までの距離Xを心外膜面から肉柱のピークまでの距離Yで除したX/Yを拡張末期のエコー像で検討し、オリジナルペーパーでは記載はないが、その後の引用文献、レビューで $X/Y \leq 0.5$ がLVNCの診断基準として採用されている。Jenniらは、①心外膜側の緻密化層(C)と心内膜側の網目状の肉柱構造を持つ心内膜側の非緻密化層(NC)の

二層構造を認め、その比率が収縮末期で $NC/C > 2.0$ であること、②緻密化障害が心室中央-側壁、心尖部、中央-下壁に好発すること、③カラードプラーで肉柱の間隙に血液の環流が確認できることを診断基準としている。

Stöllbergerらは、①4本以上の肉柱(心筋と同じエコー輝度を有し心室の収縮に同期している)を乳頭筋レベルから心尖部にかけて、エコーの1断面で確認できること、②カラードプラーで肉柱の間隙に血液の環流が確認できることとしている。

このように、Jenniらの $NC/C > 2.0$ はChinらの $X/Y < 0.33$ に相当し、また計測の時相はChinらは拡張末期、Jenniらは収縮末期であり異なっている。Stöllbergerらの診断基準は、検討項目自体がChin、Jenniらと異なる。

これらの診断基準に関しては、以下の比較検討を行った報告がある。Kohliらは、Chin、Jenni、Stöllbergerの心筋緻密化障害の診断基準を用いて成人の199人の左室収縮不全の患者のうち、一つ以上のLVNCの診断基準を満たしたのは47人(23.6%)であり、47人のうち37人(78.7%)がChinの基準を、30人(63.8%)がJenniの基準を、25人(53.2%)がStöllbergerの基準を満たしたのみであった。Saleebらは、104人の心筋緻密化障害患者を対象にJenniとStöllbergerの診断基準と予後の相関を検討したが、いずれも相関は認めなかった。成人では、神経筋疾患、産褥心筋症、腎不全患者などに、JenniやStöllbergerらの診断基準では、一過性に診断基準を満たす症例が多数存在し、過剰診断されている。

近年、心臓MRIにより本疾患の形態評価を試みる報告がなされている。Jacquierらは拡張末期の心臓MRI画像から肉柱部分の心筋重量の左室心筋重量に対する比率を計測し左室緻密化障害症例を拡張型心筋症、肥大型心筋症、正常対照群と比較検討している。その結果、20%以上であれば左室緻密化障害と診断できると報告している。Grothoffら拡張期末期においてLV

mass と LV mass の比が 25%以上かつ非緻密化 mass が 15g/m² 以上で LVNC と診断できるとしている。しかし、LVNC は小児例、とくに新生児・乳児といった低年齢が多く MRI を行うには、長時間の鎮静処置が必要であり、簡便な検査ではない。

以上より、診断には心臓超音波がもっとも有用であり、本研究から、左室駆出率は乳児例で低値であった。左室後壁厚や左室駆出率の Z-score は左室駆出率と相関が見られた。左室後壁厚の Z-score は死亡および心移植のリスクファクターであることが示された。

今後の課題：患者 iPS 細胞由来心筋細胞の機能評価

(i) iPS 細胞由来心筋細胞の分化能評価

野生株と患者由来株の間で分化能および形態的な表現において差異を生じるか、遺伝子発現レベルおよび蛋白の発現レベルを評価する。遺伝子発現レベルは real-time RT-PCR にて野生株と患者由来株 iPS 細胞由来心筋細胞の TnnT や NKX2.5 などの心筋特異的 mRNA の発現を比較検討する。蛋白の発現レベルは免疫蛍光染色およびウェスタンブロット法にて野生株と患者由来株 iPS 細胞由来心筋細胞の TnnT や NKX2.5 などの心筋特異的蛋白の発現を比較検討する。

(ii) iPS 細胞由来心筋細胞の増殖能およびアポトーシスの評価

野生株と患者由来株の間で増殖能およびアポトーシスに差異を生じるか、Flow cytometry 法と免疫組織染色を行い評価する。増殖能に関しては、iPS 細胞由来心筋細胞を BrdU にて数時間培養し、BrdU を取り込ませた上で、細胞を回収し、抗 BrdU 抗体を用いて、BrdU 陽性細胞と非 BrdU 陽性細胞の比率を算出し、野生株と患者由来株間で比較検討する。アポトーシスに関しては、TUNEL 法を用いて、免疫染色を行い、野生株と患者由来株間で差異がないか比較検討する。

(iii) iPS 細胞由来心筋細胞の電気生理学的機能測定

パッチクランプ増幅器と倒立顕微鏡を用いて iPS 細胞由来心筋細胞からパッチクランプ法記録を行い、野生株と患者由来株の電気生理学的性質を比較し、催不整脈性の有無を検討する。具体的には静電容量、ナトリウムおよびカリウム等イオンチャネルの電流密度、活性化/不活性化/脱活性化/脱不活性化速度を検査する。また、今回申請する 64ch 細胞外電位記録システムを用いて活動電位の発火頻度および持続時間を検査する。さらに、iPS 細胞由来心筋細胞に蛍光カルシウム・イメージング法を適用し、心筋の収縮能に必要な細胞内カルシウムの動態を野生株と患者由来株で比較する。

E. 結論

心筋緻密化障害は、心室壁の過剰な網目状の肉柱形成と深い間隙を特徴とした心筋症で、難治性心不全や突然死の原因となる疾患である。近年、年長児や成人の報告例も増えており、全国で1年間に約40例の小児期発症例が報告されていることから、稀な疾患ではないことが明らかになってきた。しかしながら、国内外を通じて心筋緻密化障害において系統的な臨床遺伝学的研究はなされておらず、網羅的な遺伝子異常スクリーニングの報告はない。

本研究では、NGSにより遺伝子異常が判明した患者の血液細胞から樹立した iPS 細胞から心筋細胞を誘導し、さらに iPS 細胞由来心筋細胞において関連遺伝子の機能解析を行う計画を立て、網羅的遺伝子解析の施行と iPS 細胞由来心筋細胞の樹立ができた。この全く新しい研究パラダイム樹立できたことで、従来研究上の障壁であった機能解析が生体標本にて容易に行えるようになり、今後、心筋緻密化障害関連遺伝子の網羅的解析がはじめて可能になると考えられた。

今後は患者を蓄積した上で、臨床遺伝学的検討を推し進め、iPS 細胞を用いた機能解析による評価をすすめていく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

[英文]

1. Ichida F: 心筋症、心筋炎の管理. Guidelines for Diagnosis and Treatment of Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. **Circ J** 2016;80:753-774
<http://www.j-circ.or.jp>
2. Yoshida Y, Hirono K, Nakamura K, et al. A novel ACTC1 gene mutation in a young boy with left ventricular noncompaction and arrhythmias. **Heart Rhythm Case Report**. 2016;2(1):92-97.
3. Hachiya A, Motoki K, Hirono K, Hata Y, Nishida N, Ichida F, Koike K. LVNC revealed by aortic regurgitation due to Kawasaki disease in a boy with LDB3 gene mutation. **Pediatrics International**. 2016Aug;58(8):797-800.
4. Kodo K, Ong SG, Jahanbani F, Termglinchan V, Hirono K, (他 7 名), Ichida F, Wu SM, Snyder MP, Bernstein D, Wu JC. iPSC-derived cardiomyocytes reveal abnormal TGF- β signalling in left ventricular non-compaction cardiomyopathy. **Nat Cell Biol**. 2016;10:1031-42.
5. Hata Y, Kinoshita K, Mizumaki K, Yamaguchi Y, Hirono K, Ichida F, Takasaki A, Mori H, Nishida N. Postmortem Genetic Analysis Of Sudden Unexplained Death Syndrome Under 50 Years Of Age: A Next-Generation Sequencing Study. **Heart Rhythm**. 2016 Jul;13(7):1544-51
6. Yamaguchi Y, Mizumaki K, Hata Y, Sakamoto T, Nakatani Y, Kataoka N, Ichida F, Inoue H, Nishida N. Latent pathogenicity of the G38S polymorphism of KCNE1 K⁺ channel modulator. **Heart Vessels**. 2016 Jun 2. [Epub ahead of print] PMID:27255646
7. Chida A, Inai K, Sato H, (他 17 名), Ichida F, (他 4 名). Prognostic predictive value of gene mutations in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy. **Heart Vessels**. 2016. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

[国際学会]

1. Hirono K, Takasaki A, Hata Y, (他 5 名), Ichida F. Clinical Features and Prognosis of Pediatric Patients with Left Ventricular Noncompaction. European

society for cardiology congress 2016、2016 年 8 月 27 日、ローマ

2. Ichida F: Invited Lecture Clinical features of left ventricular noncompaction: long-term clinical course and genetic background. The 6th APPCS, Oct 22. 2016, Shanghai
3. Long-term prognosis of the pediatric patients with Left Ventricular Noncompaction. Hirono K, Ce W, Hata Y, Takasaki A, Ozawa S, Nakaoka H, Okabe M, Miyao N, Saito K, Nishida N, Ichida F. 12nd International Congress of Cardiomyopathies and Heart Failure 2016、2016 年 12 月 3 日、京都

[国内学会]

1. 市田 露子 : 特別講演 心筋緻密化障害の臨床～20 年間の研究から見えたもの 第 9 回郡山セミナー 平成 28 年 4 月 23 日、郡山
2. Kinoshita K, Yokoyama R, Takahashi H, (他 3 名), Hirono K, Ichida F, Nishida N. A Novel HCN4 Mutation in a Patient with Left Ventricular Noncompaction Impairs the Pacemaker Current. 第 80 回日本循環器学会学術集会、平成 28 年 3 月 18 日、仙台
3. Hata Y, Kinoshita K, Mizumaki K, Yamaguchi Y, Hirono K, Ichida F, Nishida N. Sudden Unexpected Death of the People under 50-years-old in Japanese Hot Baths: Molecular Analysis Using Next-generation DNA Sequencing. 第 80 回日本循環器学会学術集会、平成 28 年 3 月 18 日、仙台
4. Hirono K, Hata Y, Takasaki A, (他 5 名), Ichida F. Clinical and Genetic Characteristics in the Fetal Patients with Left Ventricular Noncompaction. 第 80 回日本循環器学会学術集会、平成 28 年 3 月 19 日、仙台
5. 木下 聡、島袋祐士、平辻知也、知念清治、廣野 恵一、市田 露子、畑 由紀子、西田尚樹. 産褥期に発症した心不全で明らかになった、左室心筋緻密化障害の一例. 第 120 回日本循環器学会九州地方会、平成 28 年 6 月 25 日、大分
6. 廣野 恵一. ミニシンポジウム: 小児循環器領域における iPSC 細胞を用いた研究の現状「心筋症」. 第 52 回日本小児循環器学会総会・学術集会、平成 28 年

- 7月7日、東京
7. 廣野恵一、市田路子. パネルディスカッション：学校心臓検診の意義：各心疾患毎のアウトカムから探る「心筋症」. 第52回日本小児循環器学会総会・学術集会、平成28年7月7日、東京
 8. 小澤綾佳、廣野恵一、市田路子、他. 剖検で両心室に線維化と石灰化を認め胎児心筋緻密化障害が疑われた一例. 第25回日本小児心筋疾患学会、平成28年10月8日、東京
 9. 堀 香織、中村常之、小栗真人、岡部真子、廣野恵一、市田路子. 児の徐脈、多孔性筋性部心室中隔欠損、左室緻密化障害(LVNC)を契機に診断したHCN4 遺伝子変異の親子例. 第25回日本小児心筋疾患学会、平成28年10月8日、東京
 10. 吉田葉子、加藤有子、鈴木嗣敏、(他8名)、廣野恵一、市田路子. PRKAG2 変異による刺激伝導系異常を伴った肥大型心筋症(HCM)の兄弟例. 第25回日本小児心筋疾患学会、平成28年10月8日、東京
 11. 廣野恵一、王 策、岡部真子、(他5名)、市田路子. 心筋緻密化障害の小児患者における予後 - 心臓超音波検査の観点から -. 第25回日本小児心筋疾患学会、平成28年10月8日、東京
 12. 市田路子：教育講演 心筋緻密化障害. 第15回日本心臓血管発生研究会、平成28年10月14日、大阪
 13. 岡部真子、宮尾成明、仲岡英幸、齋藤和由、小澤綾佳、廣野恵一、市田路子. 右心低形成(hypo RV)と肥大型心筋症(HCM)を合併した小児の一例. 第36回日本小児循環動態研究会、平成28年10月21日、金沢
- 江堂 東京、2016
4. 西田直樹、市田路子：『診断モダリティとしての心筋病理：ダノン病』和泉徹・廣江道昭編 南江堂 東京、2016
 5. 田口雅登、市田路子 ワーファリンの治療・投与量予測『小児の遺伝学的検査・診断・カウンセリング 実践ケースファイル』奥山虎之、山本俊至編 診断と治療社 2016;163-165
 6. 廣野恵一、市田路子：『心筋症』小児科臨床 「小児慢性疾患の成人期移行の現状と問題点」日本小児医事出版社 東京 第69巻第4号、617-622
 7. 廣野恵一、市田路子：「孤立性左室緻密化障害」 「最新ガイドライン準拠 小児科診断・治療指針」中山書店 東京、2016
 8. 廣野恵一、市田路子：『左室心筋緻密化障害をどのように診断するか』Heart View 「遺伝性心筋疾患の現状と展望を識る」メジカルビュー 東京、2016;121-131
 9. 小澤綾佳、市田路子. 学校心臓検診を臨床に生かす呼吸と循環 2016; 7: 718-724
 10. 市田路子. 心筋症、心筋炎の管理. 学校心臓検診のガイドライン (2016年版) 日本循環器学会・日本小児循環器学会合同ガイドライン 2016;57-60 一般社団法人日本循環器学会

G. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

3. 書籍

1. 小澤綾佳、市田路子：心筋緻密化障害 竹中克編 『心エコーハンドブック 心不全』金芳堂 京都、2016
2. 廣野恵一、市田路子：心筋疾患『ガイドラインと最新文献で学ぶ小児科学レビュー2016-17』編 総合医学社 東京、2016
3. 廣野恵一、市田路子：『診断モダリティとしての心筋病理：心筋緻密化障害』和泉徹・廣江道昭編 南