

論 文 要 約

論 文 題 目

Assessment of pathogenicity of a missense variant in *TBX5* detected in cardiomyopathy patients

心筋症患者に見出された *TBX5*ミスセンス変異の病的意義の検討

富山大学大学院

医学薬学教育部（博士課程）生命・臨床医学専攻

小児科学教室

氏 名 宮尾 成明

備考 ① 論文要旨は，2,000字程度とする。

② A4判とする。

#### 〔目的〕

*TBX5*は、Holt-Oram症候群という先天性心疾患と橈側列形成不全を特徴とする症候群における原因遺伝子として報告されて以降、心臓発生と心筋細胞の成熟化の中心的な役割を担う転写調節因子であることが知られている。T-boxドメイン（アミノ酸残基56～236）がこの機能に関与する一方、近年、Nucleosome Remodeling Deacetylase (NuRD) 複合体と関わって非心臓遺伝子の発現を抑制する機能が*TBX5*-NuRD interactionドメイン（同255～264）にあることが報告された。双方のドメインは異なる経路で心臓発生と機能保持に関わるが、*TBX5*の変異はいずれの領域でも多様な心疾患を発生し、まれに心筋症を伴うことがある。従って *TBX5*の遺伝型表現型相関には未知の部分が多く、その解明が待たれている。

本学小児科学講座では、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析の先行研究の中で、心筋緻密化障害や拡張型心筋症の患者に *TBX5*のミスセンス変異(c. 791G>A, p. Arg264Lys)（以下R264K）を見出した。そこで、同変異が心臓発生または心臓機能保持にどのような影響を与えうるか評価することを目的とした。

#### 〔方法並びに成績〕

方法：

- ① 次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析を行った心筋症患者において、*TBX5*の同ミスセンス変異が見出された患者を後方視的に集積し、そのアレル頻度の比較とコンピューターアルゴリズムでの傷害性予測を行った。
- ② C57BL/6NマウスにCRISPR/Cas9システムによるゲノム編集技術を用いて、同変異の遺伝子変異導入マウスを作成した。ゲノム配列解析により目的の点変異が導入されたことを確認し、これをファウンダーマウスとして交配させ、変異導入マウス系統を確立した。これにより得られたヘテロ変異型 (*Tbx5*<sup>R264K/+</sup>)、ホモ変異型 (*Tbx5*<sup>R264K/R264K</sup>) マウスを以下の実験に用いた。マウスは10週齢をyoung adult群、6-9月齢をaged群としてそれぞれ野生株と比較した。生理学的評価として、心電図検査、心臓超音波検査（左室内径短縮率：FS、左室拡張末期径：LVDd、左室収縮末期径：LVDs、前壁径：AWD、後壁径：PWD、僧帽弁口拡張早期波：E、同心房収縮波：A）を行った。心筋の耐容能を評価するため、isoproterenol負荷（20 μg/gの単回皮下投与を7日間）による心筋症誘発実験を行い、同様に心臓超音波検査で生理学的評価を行った。病理学的評価として、安楽死後に取り出した心臓組織でHE染色とElastica-Masson染色を行った。培養細胞を用いたレポーターアッセイで、ANFのプロモーター活性を算出し、同変異による障害経路を推測した。表現型への発症経路を推察するために、左室心筋から抽出したRNAを用いて遺伝子発現変動解析を行った。

成績：

- ① 網羅的遺伝子解析を受けた心筋緻密化障害192例、拡張型心筋症41例のうち同変異がそれぞれ4例、1例に検出された（計2.0%）。これは日本人のアレル頻度（0.75%）よりも多く、複数のコンピューター解析で傷害性を有する可能性を示唆された。
- ② young adult *Tbx5*<sup>R264K/R264K</sup> マウスは野生株に対して、左室内径短縮率の低下（34.2±1.7%対39.6±5.4%, p<0.05）、心拡大（p<0.05）、左室壁の相対的壁菲薄化（p<0.01）、心体重量比の増加（p<0.01）が認められた。これは拡張型心筋症の形態学的特長と類似していた。Aged群においても心収縮力低下は持続しており、組織学的に軽度の線維化の増生が心内膜から間質にかけて出現し、リモデリングを示唆していた。Isoproterenol負荷での心機能の増悪の程度は、野生株と有意差が認められず、耐容能は同程度と考えられた。*Tbx5*<sup>R264K/+</sup> マウスでは心電図、心臓超音波解析で有意な表現型変化は認められなかった。レポーターアッセイで、ANFプロモーター活性は野生株に比較して同程度に保たれていた。young adult *Tbx5*<sup>R264K/R264K</sup> マウスと野生株の左室心筋から抽出したRNAを用いてマイクロアレイを行うと、36種類の有意に変動した遺伝子が検出された。そのうちcoding geneは8つであり、*Acta1*の発現が著しく増加していた。*Acta1*のExon splicing variant解析ではexon2が有意に欠失していたが、noncoding regionであったため、翻訳調節や遺伝子発現調節機能がここに含まれると推測した。*Acta1*の発現上昇は心不全に対する代償を示唆する一方、TBX5-NuRD interactionドメインを介した経路による過剰発現により、サルコメア成熟阻害と心機能低下を引き起こした可能性も考えられた。

〔総括〕

心筋症患者群に多く検出された *TBX5* のミスセンス変異 (c. 791G>A, p. Arg264Lys) は、遺伝子変異導入マウスによる検討の結果、ホモ変異型マウスにおいて拡張型心筋症に類似した慢性心不全を呈することが明らかとなった。ヒトとマウスの表現型の相違から、心筋症患者群における *TBX5* R264K は、心筋症の成因の一つであると考えられた。また、同変異は心臓の発生や分化を直接は妨げないが、*Acta1* の著しい増加は心不全と強く関連し、TBX5-NuRD interactionドメインを介する経路が関与する可能性も考えられた。