

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）
分担研究報告書

研究分担者 木村剛（京都大学医学系研究科・教授）

特発性心筋症に関する調査研究

研究要旨

LMNA遺伝子は核膜の裏打ち蛋白であるlamin A, Cをコードし、本遺伝子変異キャリアーは、心臓伝導障害、心房性不整脈、致死性心室性不整脈、心機能低下を来し、心臓突然死や重症心不全を引き起こす。遺伝子変異は、ミスセンス変異、ナンセンス変異、欠失・挿入変異など多様であり、重症度に関しても変異毎の差が考えられている。本研究では、LMNA一塩基変異をみとめる家族性伝導障害、拡張型心筋症症例において遺伝子発現、蛋白発現の解析による発症機序の検討を行った。

A. 研究目的

LMNA遺伝子は、核膜の裏打ち蛋白質であるlamin A, Cをコードし、その遺伝子異常により、心臓伝導障害、心房細動、致死性心室性不整脈、心機能低下を伴い、心臓突然死や重症心不全を引き起こす。我々は、家族性心臓伝導障害+拡張型心筋症を呈する症例において、エクソンの最後にミスプライシングを引き起こすと予想される一塩基変異を認め、発症機序に関する検討を行った。

B. 研究方法

患者末梢血よりDNAを抽出し、LMNAコード領域のシーケンシングを行った。また、末梢血、開心術時の心組織において、相補的DNA（cDNA）のQPCR法による遺伝子発現定量、ウエスタンブロッティング法による蛋白発現定量を行った。ミスプライシングに関しては、minigeneを用いたプライシングの検討を行った。

（倫理面への配慮）

遺伝子解析は、施設の倫理委員会にて承認を受け、インフォームドコンセントを行い施行した。

C. 研究結果

症例は、複数のペースメーカー植込み、心臓伝導障害、心機能低下を認める2家系であり、LMNA遺伝子解析にて、有症状者のみにおいてLMNA p.Q312Hを検出した。本変異は、エクソン5の最後の一塩基変異であり、プライシング予想プログラムでは、変異により4塩基前にプライシングドナーサイトが移ることが予想された。患者末梢血、心組織におけるcDNAの解析では、野生型のシーケンシングのみで、変異アレル由来の配列は認めなかった。ミニジーンプラスミドを用いた解析では、予想プログラム通り、プライシングドナーサイトが4塩基前に移動するミスプライシングを認めた。患者心組織におけるcDNA半定量評価では、LMNAの発現が約半分以下に低下しており、機序としてナンセンス変異依存mRNA分解機構（NMD）により変異アレル由来のmRNAが分解されていることが考えられた。さらに、qPCR法では、患者末梢血、心組織両者において、LMNA遺伝子は10%程度しかmRNA発現を認めず、ウエスタンブロッティングでは、laminA, Cとも蛋白発現を認めなかった。

D. 考察

LMNA p.Q312H症例における疾患発症機序の検討

を行い、プライシング予想プログラム、ミニジーン解析では、エクソン最後の一塩基変異によるプライシングドナーサイトの変化によるプライシングエラーが生じている可能性が示唆された。しかし、患者サンプルでは、LMNAのmRNA、蛋白ともかなり低値であり、変異アレルのみ分解されるNMDでは説明できない。野生型アレルの発現も低下する未知のメカニズムの存在が示唆された。

E. 結論

LMNA p.Q312H症例における疾患発症機序の検討を行い、ミスプライシングの関与や未知の野生型アレル発現抑制メカニズムの存在が示唆された。このような発症メカニズムの検討は、LMNA関連心筋症の変異による重症度の違い、患者診療におけるリスク層別化への応用が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 学会発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表（発表誌面巻号・ページ・発行年等も記入）

- ① Yamamoto Y, Makiyama T, Kondo Y, Iriyama Y, Ishikawa R, Wuriyanghai Y, Kohjitani H, Hirose S, Gao J, Kashiwa A, Hai H, Aizawa T, Imamura T, Ishikawa T, Yoshida Y, Ohno S, Horie M, Makita N, Kimura T. Preclinical Proof-of-Concept Study Antisense-mediated Knockdown of CALM as a Therapeutic Strategy for Calmodulinopathy, European Society of Cardiology (ESC) Congress 2020, on line, 2020.8.29-9.1
- ② Kashiwa S, Makiyama T, Kohjitani H, Maurissen T, Wuriyanghai Y, Yamamoto Y, Gao H, Huang H, Imamura T, Aizawa T, Ishikawa T, Ohno S, Toyoda F, Sato S, Takahashi K, Woltjen K, Horie M, Makita N, Kimura T. Inhibition of Late Sodium Current Attenuates Prolonged Action Potential Durations in CACNA1C-E1115K iPS Cell Model with Disrupted Cav1.2 ion Selectivity, The Heart Rhythm Society's Annual Scientific Sessions 2020 (HRS2020), on line, 2020.5.6-5.9
- ③ Kashiwa S, Makiyama T, Maurissen T, Kohjitani H,

Wuriyanghai Y, Yamamoto Y, Gao J, Hai H, Imamura T, Aizawa T, Ishikawa T, Ohno S, Toyoda F, Sato S, Takahashi K, Woltjen K, Horie M, Makita N, Kimura T. Human Induced Pluripotent Stem Cell Model of CACNA1C-E1115K which Impairs Ion Selectivity of the Cardiac L-type Calcium Channel. 第 84 回日本循環器学会学術集会, 2020.7.9, 京都 web 開催

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし