

氏 名	福山 恵
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士 甲第 699 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位授与年月日	平成 2 6 年 3 月 1 0 日
学位論文題目	Nonsense-Mediated mRNA Decay due to a CACNA1C Splicing Mutation in a Patient with Brugada Syndrome (Brugada 症候群患者における CACNA1C 遺伝子スプライシング変異によるナンセンス変異依存 mRNA 分解機構)
審査委員	主査 教授 松浦 博 副査 教授 岡村 富夫 副査 教授 三ッ浪 健一

論文内容要旨

*整理番号	705	(ふりがな) 氏名	ふくやま めぐみ 福山 恵
学位論文題目	<p>Nonsense-Mediated mRNA Decay due to a <i>CACNA1C</i> Splicing Mutation in a Patient with Brugada Syndrome</p> <p>(Brugada 症候群患者における <i>CACNA1C</i> 遺伝子スプライシング変異によるナンセンス変異依存 mRNA 分解機構)</p>		
<p>【目的】 QT 延長症候群(LQTS)・Brugada 症候群(BrS)に代表される遺伝性不整脈疾患において、心筋イオンチャンネルをコードする遺伝子変異の関与が明らかになっている。BrS は心臓突然死と関連する遺伝性不整脈疾患であり、心電図右側胸部誘導において特徴的な ST セグメント上昇を呈する。BrS の原因遺伝子としては、ナトリウムチャンネルをコードする <i>SCN5A</i> 遺伝子変異が最も高頻度であるが、L 型心筋カルシウムチャンネル(LTCC)をコードする遺伝子(<i>CACNA1C</i>・<i>CACNB2b</i>)異常も報告されており、欧米での頻度は 10%程度といわれている。しかしながら、アジア人コホートにおける LTCC 遺伝子変異の頻度については不明である。本研究に先駆けて、我々は BrS 及び早期再分極症候群(ERS)、QT 短縮症候群(SQTS)、特発性心室細動(IVF)と診断された日本人コホートにおいて LTCC 遺伝子変異の頻度を明らかにした(参考論文-1)。本研究では、先の研究で同定された <i>CACNA1C</i> 遺伝子スプライシング変異について、これまで BrS では報告されていないナンセンス変異依存 mRNA 分解機構(nonsense-mediated mRNA decay, NMD)が関与している可能性に着目し、メカニズムの解明を試みた。</p> <p>【方法】 原因遺伝子変異検索目的にて滋賀医科大学循環器内科および京都大学大学院循環器内科学講座に登録された約 1300 家系より、BrS・ERS・SQTS・IVF と診断された 312 名の発端者を抽出し、<i>CACNA1C</i>・<i>CACNB2b</i> 遺伝子を解析した。遺伝子のスクリーニングは high-resolution melting(HRM)法および direct sequence 法にて行った。結果、5 種の <i>CACNA1C</i> 変異を 6 名の BrS 患者に同定した。5 変異のうち 1 変異(<i>CACNA1C</i>-R632R)は塩基置換部位が <i>CACNA1C</i>-exon14 の 1 塩基目に存在しており、スプライシングエラーを生じるものと考えられた。このスプライシング変異について、発端者および家族より新たに新鮮末梢血を採取し、mRNA を抽出した。RT-PCR により mRNA から cDNA 合成を行い、direct sequence 法による配列確認および LightCycler®を用いて、Advanced relative quantification 法による定量解析を行った。またスプライシングエラーについては、培養細胞での再現を試みた。</p> <p>【結果】 <i>CACNA1C</i>-R632R 保因者の臨床経過としては 27 歳時に心室細動を来し、電気生理学検査でも心室細動が再現されたため植え込み型除細動器(ICD)の植え込みが為されていた。家系内の遺伝子検索では、発端者の長女に同変異が同定されたが、長女は無症状であり、Brugada 様</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

心電図変化にも乏しかった。発端者の第2子である長男には変異は認めなかった。

変異保持者である発端者及び長女から得た cDNA を direct sequence にて解析したところ、変異 allele が消失していた。定量解析では同家系内の変異非保持者(長男)と比較して、変異保持者(発端者及び長女)の *CACNA1C*-mRNA 発現量がそれぞれ約 44%(発端者)、約 30%(長女)減少していた。培養細胞によるスプライシング変異の再現については、変異の有無に関わらず、培養細胞内と生体内とでスプライス部位が全く異なっており、生体内でのスプライス部位を決定するメカニズムと培養細胞内でのメカニズムが異なっている可能性が示唆された。生体内でのスプライス機序は、培養細胞では確認することができなかった。

【考察】本研究において、*CACNA1C* スプライシング変異を有する家系内で臨床像を比較したところ、発端者(38歳男性)よりも同変異を有する長女(13歳)の方が臨床像は軽微であった。2者間の臨床像の違いについては、以前より、BrS の表現型を呈するのは男性に多いが、変異の遺伝率については男女共に同程度であるという考察が為されており、本研究でもその考察を裏付ける結果となった。また BrS は、幼少時には診断が付きにくい疾患であり、年齢による表現型の違いも考えられた。

遺伝性不整脈分野におけるスプライシング変異の代表的なものとして LQTS type1 で同定された *KCNQ1*-A344A 変異があるが、この変異は NMD を生じない。一方で NMD については、LQTS type2 において *KCNH2* 遺伝子のナンセンス変異から NMD が惹起されるという報告がある。また、これまで為されてきた BrS における LTCC 変異の報告は、アミノ酸変異を伴うチャネル機能異常によるものであった。本研究においては、BrS 患者における LTCC 遺伝子の同定に加え、NMD を呈するスプライシング変異について初めて報告したものである。BrS はその疾患概念が提唱されてから約 20 年が経過しているにも関わらず、確立されている治療法は未だ ICD 植え込みのみである。遺伝子変異によるチャネル機能への影響を明らかにすることで、薬物治療など新たな治療法の確立が待たれる。

【結論】

本研究では、*CACNA1C* のスプライシング変異および NMD による mRNA 発現量の減少が LTCC 機能低下を惹起し、BrS を呈するという新たなメカニズムの存在が示された。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	705	氏名	福山 恵
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>本研究はブルガダ症候群において、アジア人コホートにおける L 型心筋カルシウムチャンネル変異の同定を行い、且つ同定された CACNA1C 遺伝子スプライシング変異について、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (NMD) が関与している可能性に着目し、解明を行ったものである。</p> <p>変異保因者とその家系内でのゲノム DNA 及びメッセンジャー RNA・相補 DNA を解析した結果、以下の点が明らかになった。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 家系内の遺伝子検索では、発端者の長女に同変異が同定されたが、長女は無症状であり、ブルガダ型心電図変化にも乏しかった。発端者の第 2 子である長男には変異は認めなかった。 2) 変異保因者の相補 DNA において、変異アレルが消失していた。 3) CACNA1C-mRNA の定量解析では、変異非保因者の長男と比較して、変異保因者である発端者で約 44%、長女で約 30% の発現量減少を認めた。 <p>上記の結果より、本スプライシング変異が NMD を惹起するため mRNA の発現量が低下し、L 型心筋カルシウムチャンネルの機能低下を来すことによりブルガダ症候群の病型を呈するというメカニズムが明らかになった。</p> <p>本研究は、L 型心筋カルシウムチャンネル変異によるブルガダ症候群の発症メカニズムに対して新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 584 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 26 年 1 月 29 日)</p>			