

# 拡張型心筋症オミックスを用いた心筋変性機構の解明

寺本了太

理化学研究所 生命医科学研究センター 応用ゲノム解析術研究チーム

## 【研究の背景】

難治性疾患である拡張型心筋症は特に Lamin A/C 遺伝子 (*LMNA*) の変異を原因とする場合、徐脈性不整脈を呈し、突然死を引き起こすことが知られている。心筋組織においては心筋細胞がその周囲に存在する線維芽細胞、血管内皮細胞等と活発なシグナル伝達網を介してそれぞれの細胞運命を決定付け、さらに免疫系細胞による新陳代謝を受けることで組織としての恒常性を保っている。我々はゼブラフィッシュモデルを用いた心臓光学マッピング法により、*LMNA* タンパク切断型変異が心内興奮伝導を破綻させることを明らかにし<sup>1)</sup>、その分子病態として *LMNA* 遺伝子変異を起点とした転写制御機構と下流にある細胞外マトリックス増殖抑制機構の破綻によって心筋変性が引き起こされるとの仮説を立てた。

## 【目 的】

我々は中長期的課題として拡張型心筋症における心筋線維化を惹起する分子病態を解明し、重症化に先行して進行する線維化を抑制する創薬シーズの発見を目指している。本研究課題では、多層的な実験・解析計画の中核を成す心筋組織を用いたトランスクリプトーム解析による心筋変性機構の解明を目的とする。

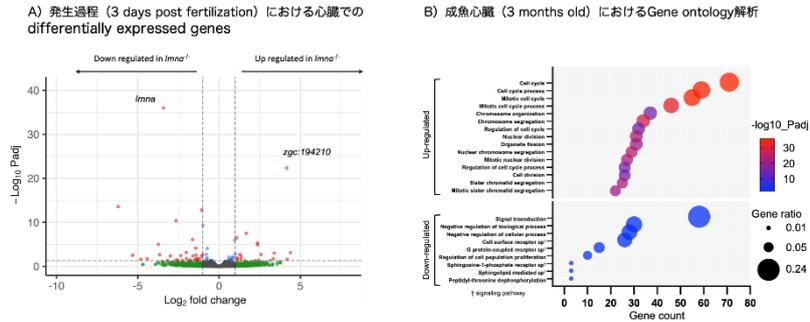
## 【方 法】

ゼブラフィッシュを実験動物として用い、ヒト *LMNA* のゼブラフィッシュ相同遺伝子である *lmna* を CRISPR/Cas9 技術を用いてノックアウト (KO) した。KO 体において、心臓トランスクリプトーム解析、心機能解析、光学マッピング技術を用いた生理学的機能解析等の多層的な機能解析を行い、細胞運命を決定する分子発現、およびその発現の制御メカニズムを解析することで、心筋変性が発動・増強する機序を解明する。

## 【結 果】

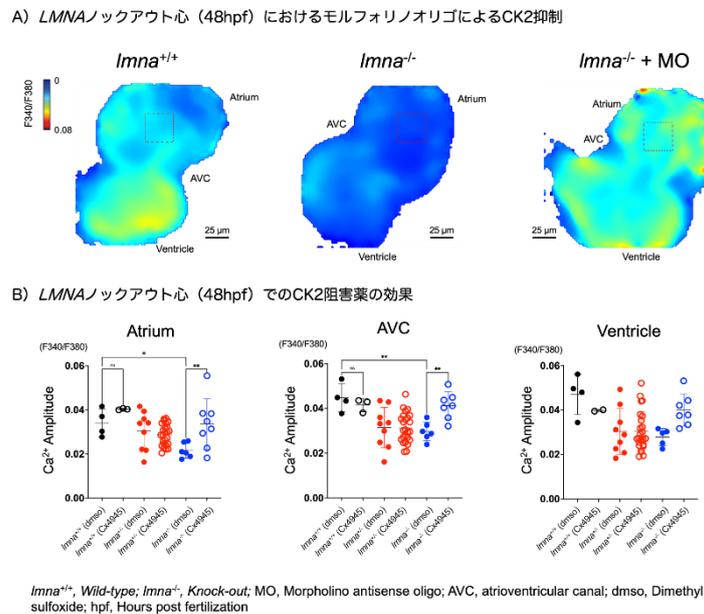
幼魚心を対象とした光学マッピング解析により、KO 体では房室結節における興奮伝導速度の低下を認め、本モデルの妥当性が確認された。次に、心筋組織の RNA シーケンスによりトランスクリプトーム解析を行い、発生段階の KO 体の心臓において、細胞死プロセスに関わり癌関連分子としても注目されるカゼインキナーゼ 2 (CK2) のサブユニット (*zgc:194210*) が高度に活性化されていた (図 1A)。また、KO 体成魚の心臓では、細胞機能恒常性に関連する遺伝子発現を集積したクラスター解析を行うことにより細胞分裂・クロマチン分離に関わる分子パスウェイが強く抑制されていることが示された (図 1B)。

図1 LMNAノックアウトゼブラフィッシュにおける心臓トランスクリプトーム解析



次に *zgc:194210* のゲノム配列に対するアンチセンスモルフォリノオリゴ (MO) を設計し、1 細胞期の胚に注入した。その結果、MO 投与群では、KO 体 (*Imna*<sup>-/-</sup>) における房室接合部 (AVC) および心室の Ca イオン流振幅低下が回復した (図 2A)。さらに、CK2 経路の抑制が *Imna* 変異による心筋伝導障害に与える影響を確認するために、CK2 阻害剤である Silmitasertib (Cx4945) を用いたレスキュー実験を実施した。CK2 阻害剤の投与により、変異によって抑制された興奮伝導速度の回復とともに Ca イオン動態改善が房室接合部に観察された (図 2B)。

図2 心臓カルシウムマッピング技術を用いたCK2抑制の生理機能解析



*Imna*<sup>+/+</sup>, Wild-type; *Imna*<sup>-/-</sup>, Knock-out; MO, Morpholino antisense oligo; AVC, atrioventricular canal; dms, Dimethyl sulfoxide; hpf, Hours post fertilization

## 【考 察】

Lamin A/C は核膜の裏打ちタンパク質である核ラミナを構成する主な分子であり、遺伝情報の源であるクロマチンには核ラミナと結合するラミン関連ドメインが多数存在し、この部分で転写の制御を受けることが明らかにされている<sup>2)</sup>。さらに核ラミナは細胞分化・増殖に関わる BMP シグナルパスウェイを活性化させる一方、細胞外マトリックスへの線維化シグナルを活性化させている。

我々は LMNA 自身がゲノム上の LMNA 関連ドメインを介した核膜直下におけるクロマチンリモデリングの制御機能を備えていることから、KO 体においては細胞恒常性を統御するシグナルシステムに異常をきたしていると考えた。KO 体におけるトランスクリプトーム解析で異常活性が確認された CK2 が触媒する JAK-STAT シグナルパスウェイ<sup>3)</sup>はその有力な候補であり、これを選択的に阻害する Silmitasertib を用いた機能解析を行った。Silmitasertib への曝露は、*Imna* 欠損による電気生理学的異常を改善し、心臓発生過程における Ca 恒常性を正常化する役割を果たした。このことは *Imna* ノックアウトマウス胚線維芽細胞において CK2 活性を正常化させることで DNA 損傷修復が促進され、早老様の特徴が改善された報告<sup>4)</sup>と底通している。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

拡張型心筋症は本邦における心臓移植の原因疾患第一位であり、その普及率の低さも相まって待機中に心不全死する患者が多い。近年のゲノム情報解析技術の飛躍的な向上に伴い、遺伝子診断は臨床に実装されつつあるが、疾患特異的な治療薬の開発が待たれる。本研究課題では LMNA 変異に起因する拡張型心筋症モデルを作成し、その心臓トランスクリプトーム解析および空間的電気生理機能解析により病態形成に深く関わる酵素機能異常を見出した。この創薬シーズを起点として、本症の心筋病理の中核をなす心筋線維化に関わる分子パスウェイの同定が期待される。

## 【参考・引用文献】

- 1) Impact of functional studies on exome sequence variant interpretation in early-onset cardiac conduction system diseases. Hayashi K\*, Teramoto R\*, Nomura A, Asano Y, Beerens M, Kurata Y, Kobayashi I, Fujino N, Furusho H, Sakata K, Onoue K, Chiang D, Kiviniemi T, Buys E, Sips P, Burch M, Zhao Y, Kelly A, Namura M, Kita Y, Tsuchiya T, Kaku B, Oe K, Takeda Y, Konno T, Inoue M, Fujita T, Kato T, Funada A, Tada H, Hodatsu A, Nakanishi C, Sakamoto Y, Tsuda T, Nagata Y, Tanaka Y, Okada H, Usuda K, Cui S, Saito Y, MacRae C, Takashima S, Yamagishi M, Kawashiri MA, Takamura M. *\*Equal Contribution. Cardiovasc Res.* 2020;116:2116-2130.
- 2) Activation of PDGF pathway links LMNA mutation to dilated cardiomyopathy. Lee J, Termglinchan V, Diecke S, Itzhaki I, Lam CK, Garg P, Lau E, Greenhaw M, Seeger T, Wu H, Zhang JZ, Chen X, Gil IP, Ameen M, Sallam K, Rhee JW, Churko JM, Chaudhary R, Chour T, Wang PJ, Snyder MP, Chang HY, Karakikes I, Wu JC. *Nature.* 2019;572:335-340.
- 3) Protein kinase CK2: a potential therapeutic target for diverse human diseases. Borgo C, D'Amore C, Sarno S, Salvi M, Ruzzene M. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6:183.
- 4) Lamin A buffers CK2 kinase activity to modulate aging in a progeria mouse model. Ao Y, Zhang J, Liu Z, Qian M, Li Y, Wu Z, Sun P, Wu J, Bei W, Wen J, Wu X, Li F, Zhou Z, Zhu WG, Liu B, Wang Z. *Sci Adv.* 2019;5:eaav5078.