

氏 名	内貴 乃生
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士 甲第696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26年 3月10日
学位論文題目	A Molecular Mechanism for Adrenergic-Induced Long QT Syndrome (アドレナリン誘発性QT延長症候群の分子機序)
審査委員	主査 教授 岡村 富夫 副査 教授 扇田 久和 副査 教授 江口 豊

論文内容要旨

※整理番号	702	(ふりがな) 氏名	ないきのぶ 内貴乃生
学位論文題目	A Molecular Mechanism for Adrenergic-Induced Long QT Syndrome (アドレナリン誘発性 QT 延長症候群の分子機序)		
<p>【目的】</p> <p>先天性 QT 延長症候群(LQTS)は、"Torsade de Pointes"と呼ばれる多形性心室頻拍と心室細動のために失神や突然死を引き起こす疾患である。遺伝子変異が特定された LQTS のうち 1 型 LQTS は最も多く全体の約 40~50%を占める。1 型 LQTS は心臓の活動電位のプラトー相における重要な再分極電流である遅延整流 K⁺電流チャネル (I_{Ks}) の α-サブユニットを code する <i>KCNQ1</i> の変異によって引き起こされる。I_{Ks} チャネルの発現低下や機能不全は QT 間隔の延長を引き起こす。またアドレナリン刺激は PKA を活性化し、<i>KCNQ1</i> α-サブユニットをリン酸化することによって I_{Ks} チャネル電流を増加する。1 型 LQTS 患者では <i>KCNQ1</i> の遺伝子変異により I_{Ks} 機能の低下を起しアドレナリン刺激に対する応答も低下しているため、心事故は運動中、特に水泳中に多い。我々は 4 家系から、11 人にヘテロ接合ミスセンス <i>KCNQ1</i> 変異 G269S を同定した。心電図における彼らの QTc 間隔は、安静時は正常から境界であったが、運動後は大幅な延長を示した。私たちは、これらの家系に認めた変異 'G269S' を組み込んだ I_{Ks} チャネルを哺乳類細胞に発現させ、アドレナリン誘発性 LQTS の分子細胞メカニズムの解明を試みた。</p> <p>【方法】</p> <p>書面による同意を得られた LQTS 患者から採血し、リンパ球より抽出した Genomic DNA を用い遺伝子解析を行った。I_{Ks} の α-サブユニットである <i>KCNQ1</i> のワイルドタイプ(WT)、<i>KCNQ1</i>-G269S 変異、又は両者を、Chinese Hamster Ovary cell (CHO cell) 又は Human Embryonic Kidney 293 cells (HEK293)に共発現させ、Whole cell パッチクランプ法にて細胞膜電流を記録した。電流はコントロール状態に加え、イソプロテレノール負荷後、PKA 刺激薬投与後、及び β-アドレナリン刺激によるリン酸化を模した S27D 変異を組み込んだ状態で記録された。</p> <p>【結果】</p> <p>遺伝子検索により <i>KCNQ1</i>-G269S 変異を同定された 4 家系に対しても遺伝子検索を行い、合計 11 人の <i>KCNQ1</i>-G269S 変異キャリアを同定した。このうち 8 人に運動負荷試験が行われたところ、安静時の QTc 間隔は 441 ± 44 mSec と軽度の延長のみだったが運動後は 485 ± 14 mSec まで著明に延長した ($P < 0.05$)。また本遺伝子変異を有する患者の内、ダンス中に失神をきたした 22 歳女性は、β-アドレナリン遮断薬メトプロロール酒石酸の服用開始後は発作を認めていない。</p>			

KCNQ1-WT と KCNQ1-G269S を CHO cells に共発現させ、KCNQ1-G269S の cDNA 量を変化させて電流を記録した。KCNQ1-G269S は濃度依存的に定常状態の電流と tail current の両方を減少させた。また tail current density は、WT に比べ変異遺伝子を発現させた細胞で有意に減少しており、この mutation は KCNQ1 機能に軽度のドミナントネガティブ抑制を示した。この tail current を標準化して電流電圧曲線を描くと、KCNQ1-G269S はこの曲線をポジティブ電位にシフトした。また -60 mV から -30 mV の間で濃度依存的に I_{Ks} 脱活性化速度を加速させた。

次に KCNQ1-WT と G269S を単独又は混合で発現させた HEK293 cells にイソプロテノール又はフォルスコリンとイソブチルメチルキサンチンのカクテルを加えて各々電流を記録した。WT を発現させた細胞では、イソプロテノールと PKA 刺激薬の両方で tail current density を著しく増加させた。対照的に、G269S 又は WT + G269S を発現する細胞は両薬剤に対する tail current の応答を劇的に減少させた。更に S27 を疑似リン酸化させた KCNQ1-S27D 変異を設計し、これと G269S 変異を同時に組み込んだ遺伝子も設計した。この遺伝子を発現させて I_{Ks} 電流を記録したところ、WT と比較し、S27D では I_{Ks} 電流が著明に増加しており、イソプロテノールを投与しても tail current はそれ以上あまり変化を示さなかった。また一方 G269S に比べ、S27D-G269S はピークの tail current を増加させなかった。

【考察】

遺伝子型が確認された LQTS 患者の約 20~25% は正常範囲の QTc を有し、これらの無症候性変異キャリアの割合は LQTS の他の 2 つの主要なタイプ (LQT2, 19% と LQT3, 10%) に比べ LQT1 (36%) で有意に高い。そしてこれらの表面上健康な変異キャリアでも、労作誘発性の致死的心室性不整脈の発生は報告されている。

KCNQ1-G269S は I_{Ks} チャネルの "loss of function" 効果を呈したが、典型的な Dominant-Negative effect 程の機能抑制は引き起こさなかった。人間の心室筋細胞では通常、安静時心室活動電位の調節には、 I_{Kr} と I_{CaL} が主要な役割を果たしている。したがって、 I_{Ks} で軽度から中等度の loss of function を起こす KCNQ1-G269S のような変異は、安静時の心室活動電位にほとんど影響を与えない可能性がある。一方 I_{Ks} は、 I_{CaL} による過度の心室活動電位持続時間または QT 延長を防ぐために、カテコールアミンに非常に sensitive に反応し電流量を増加させ、アドレナリン刺激時の心室活動電位を調節するのに主要な役割を果たしている。しかし KCNQ1-G269S 変異は β -アドレナリンアゴニストおよび PKA 刺激薬に対する I_{Ks} チャネルの応答を抑制しており、特に運動中の過剰な心室活動電位持続時間の延長を導き得ることが示された。また我々の実験では S27D 変異 I_{Ks} チャネルは PKA が媒介する I_{Ks} チャネルのリン酸化を模倣し、 I_{Ks} 電流を増加することを実証した。しかし、S27D と G269S 変異を共に組み込んだ I_{Ks} チャネルでは PKA によるリン酸化を模倣した働きを示さなかった。したがって、G269S は S27 のリン酸化が I_{Ks} に及ぼす機能的効果を妨げることが示された。

【結論】

G269S は I_{Ks} チャネルの軽度の Dominant-Negative 抑制を起こし、PKA 刺激反応性の I_{Ks} の up regulation をほぼ完全に抑制した。これは G269S 変異を有する患者での運動依存性に顕在化する QTc 延長の理由である可能性が示唆された。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	702	氏名	内貴 乃生
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>先天性QT延長症候群(LQTS)は心筋イオンチャネル関連タンパクの先天的異常により生じる。LQTSで最も頻度の高い1型は、遅延整流カリウム(I_{Ks})チャネルのαサブユニットをコードするKCNQ1の遺伝子異常により生じる。同チャネルはアドレナリンによるPKA活性化刺激によりチャネル電流が増加するため、運動時に生じる不整脈との関連が示唆される。今回は、LQTS患者群からKCNQ1にG269Sの遺伝子変異を有する11人の患者を同定し、同変異を組み込んだ培養細胞にアドレナリン等の薬物刺激を加える方法で機能解析を行った結果、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) KCNQ1-G269S変異を有する患者では、運動負荷によりQT延長が生じた。 2) 同変異を発現させた培養細胞では、I_{Ks}チャネルの機能低下と共にチャネルタンパクの発現が低下した。 3) I_{Ks}チャネルの機能低下には、PKAによるリン酸化以降の機序を抑制している。 <p>本論文は、アドレナリン誘発性QT延長症候群の分子機序につい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 506 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成26年 / 月 日 / 日)</p>			