

氏 名	よし だ ひで ただ 吉 田 秀 忠
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2340 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Characterization of a novel missense mutation in the pore of HERG in a patient with long QT syndrome. (QT 延長症候群における HERG 遺伝子ポア領域の新規ミスセンス変異の機能解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 野 間 昭 典    教 授 藤 田    潤    教 授 篠 山 重 威

### 論 文 内 容 の 要 旨

大規模な家系をもとにした分子遺伝学的アプローチにより Keating らは、1995年に心電図上 QT 時間の著明な延長、特徴的な多形性心室性頻拍を起こし突然死をもたらす QT 延長症候群 (LQTS) の病因遺伝子として心筋イオンチャネルである *SCN5A* と *HERG* 遺伝子変異を報告した。その後、*KCNQ1*、*KCNE1*、*KCNE2* などの遺伝子変異が LQTS において相次いで報告された。遺伝子変異解析と変異イオンチャネル機能解析という手法により LQTS の分子レベルでの病態解析がおこなわれるようになってきた。これまでに報告されている LQTS 遺伝子変異のいくつかのチャネル機能検討により、LQTS においては心筋活動電位に関与する膜電流の減少あるいは性質の変化により、心筋活動電位持続時間の延長がもたらされると考えられるようになってきたが、LQTS に関与する遺伝子が多く存在し、それぞれの遺伝子変異が多様であることが分かってきており、遺伝子変異の同定とその機能解析は LQTS の発症メカニズム解明に重要であると考えられる。今回我々は、LQTS における遺伝子変異を検索するとともにその遺伝子変異がどのような機能異常をもたらすかを明らかにし、また、臨床において治療に有効であった抗不整脈薬の薬理効果を検討した。

インフォームドコンセントを得た上で末梢白血球ゲノム DNA を検体として PCR-SSCP (polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism) 解析法と直接塩基配列決定法にて遺伝子変異スクリーニングをおこなった。 $\beta$ 遮断薬と class Ib の抗不整脈薬 (塩酸アプリンジン) が治療に有効であった孤発例 LQTS (26歳女性) において新たな *HERG* 遺伝子変異を同定した。これは629番目の非電荷性アミノ酸のアスパラギンから陽性電荷性アミノ酸のリジンへのミスセンス変異 (N629K) であった。この変異部位はイオンチャネルのポア領域 (チャネル構造上  $K^+$  イオン選択フィルター) の近傍であり、他の動物でも高度に保存されているアミノ酸であり、この変異はチャネル機能を著しく変化させる LQTS の病因遺伝子変異の可能性が示唆された。そこで、この変異の電気生理学的特徴を検討するために哺乳類培養細胞 (COS7) に変異チャネル遺伝子導入してパッチクランプ法をおこなった。野生株 (WT) *HERG* 遺伝子を発現させた細胞では電位固定法にて内向き整流性のみられる E-4031 感受性の  $K^+$  電流が記録された。(IKr 電流) N629K 変異を導入した *HERG* 遺伝子を発現させた細胞では電流の発現はみられなかった。症例と同じく WT-*HERG* と変異 *HERG* とを共発現させた細胞ではわずかな電流のみみられるのみで、野生株の電流密度の9.2%であり、この変異は正常遺伝子の機能を抑制する Dominant Negative 効果がみられることを証明した。LQTS のメカニズムとして Dominant Negative 効果による正常 *HERG* 電流の減少、それによる活動電位持続時間の延長が考えられた。

さらに、治療に有効であった抗不整脈薬 (アプリンジン) の *HERG* 電流と *KCNQ1/KCNE1* 電流に対する抑制効果を培養細胞系にて検討した。*HERG* 遺伝子は心筋における遅延整流カリウムチャネルの速い特性を持つ電流 (IKr) を構成するイオンチャネル蛋白をコードしており、*KCNQ1* 遺伝子と *KCNE1* 遺伝子は遅延整流カリウムチャネルの遅い特性を持つ電流 (IKs) をコードしている。有効治療域ではアプリンジンは *HERG* 電流を選択的に抑制することが判明した。(IC50 0.23 $\mu$ M) 従ってアプリンジンの薬理効果は他の膜電流系への効果による可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本論文では、QT 延長症候群における HERG 遺伝子の変異同定とその機能解析を行い、さらに、治療に有効であった抗不整脈薬の心筋  $K^+$  電流への薬理効果を検討している。末梢血 DNA より PCR-SSCP 法と塩基配列決定法にて、 $\beta$  遮断薬と抗不整脈薬（アプリンジン）が有効であった症例において新規 HERG 変異を同定した。これはチャネルボア領域の629番目のアスパラギンがアラジニンへのミスセンス変異（N629K）であった。培養細胞に変異 HERG を導入して全細胞型パッチクランプ法にてその機能を検討した。野生型 HERG を発現させた細胞では  $K^+$  電流がみられたが、N629K 変異では電流の発現はみられず、野生型と N629K 変異型を共発現させると発現電流の著明な減少がみられた。この遺伝子変異が Dominant Negative 効果をもち、変異チャネルにより心筋再分極  $K^+$  電流の減少、活動電位持続時間の延長が病態として考えられた。さらに、治療に有効であったアプリンジンのヒト再構成遅延整流  $K^+$  電流への薬理効果を検討したところ、有効治療域では  $IK_s$  電流を抑制せず HERG 電流（ $IK_r$ ）を選択的に抑制した。従って、アプリンジンは他の膜電流成分への効果による可能性が示唆された。

以上の研究はイオンチャネル病である QT 延長症候群における変異遺伝子機能の解明に貢献し、QT 延長症候群の病態解明に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成13年2月19日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。