

京都大学	博士（ 医学 ）	氏 名	服 部 哲 久
論文題目	A novel gain-of-function <i>KCNJ2</i> mutation associated with short QT syndrome impairs inward rectification of Kir2.1 currents （QT 短縮症候群患者において検出された新規 <i>KCNJ2</i> 遺伝子異常は、Kir2.1 電流の内向き整流性を障害することにより機能亢進を示す）		
（論文内容の要旨） QT 短縮症候群は、心電図上、QT 間隔短縮を特徴とし、突然死を引き起こす難治性心疾患として近年注目されている。原因として数種類のイオンチャネルの遺伝子異常が報告されているが、報告数が少なく、発症機序には不明な点が多い。本研究では QT 短縮症候群と診断された患者において原因遺伝子を検索した。 患者は 8 歳女児。心電図上の著明な QT 間隔短縮（QT 間隔 172 ms、補正 QT 間隔 194 ms）、発作性心房細動、心筋の易刺激性（右心カテーテル検査の際、カテーテルの接触刺激により容易に上室性頻拍や心室細動が誘発）より、QT 短縮症候群と診断された。末梢血よりゲノムを抽出し、高速液体クロマトグラフィーを用いた候補遺伝子解析の結果、 <i>KCNJ2</i> 遺伝子においてヘテロミスセンス変異（c. 902T>A, p. M301K）を検出した。 <i>KCNJ2</i> 遺伝子は Kir2.1 チャネルをコードし、脱分極時に外向きコンダクタンスが低下する内向き整流性を特徴とした K 電流（Kir2.1 電流）を形成する。健常人 400 アレルの解析では同遺伝子変異を認めなかった。 ヒト胎児腎由来培養細胞（HEK 293 細胞）に <i>KCNJ2</i> 遺伝子を発現させ、ホールセル・パッチクランプ法を用いた電気生理学的機能解析を施行した。その結果、M301K 変異チャネルのみ発現させた細胞では機能的 Kir2.1 電流を認めなかったが、野生型と同変異チャネルを共発現させた細胞では Kir2.1 電流の内向き整流性が障害され、機能亢進の所見を示した。 Kir2.1 チャネルは四量体構造をしており、M301 はチャネルの細胞質側、孔に近接した場所に存在している。 <i>KCNJ2</i> -M301K 変異による電流変化の機序として同部位におけるアミノ酸残基の電荷の変化が関連していると推測したため、M301 におけるアミノ酸残基の電荷を変化させ（M301A（中性 → 中性）、M301R（中性 → 正電荷））、同様の機能解析を施行した。M301A のみ発現させた細胞、野生型と M301A 変異チャネルを共発現させた細胞ともに内向き整流性が保たれていたが、M301R では、M301K と同様に、野生型と変異チャネルを共発現させた細胞では Kir2.1 電流の内向き整流性が障害され、変異チャネルのみ発現させた細胞では機能的な Kir2.1 電流を認めなかった。このことより、 <i>KCNJ2</i> -M301K 遺伝子変異による電流変化が、M301 におけるアミノ酸残基の電荷の変化（中性 → 正電荷）と関連していることが示唆された。 次に、この電流の変化による活動電位の変化を検証するため、新生児ラット単離心室筋細胞に野生型または変異チャネルを過剰発現させ、活動電位を記録した。野生型 <i>KCNJ2</i> 遺伝子を過剰発現させた心筋細胞では活動電位持続時間はコントロールより短縮したが（ $P < 0.001$ ）、野生型と変異チャネルを同量過剰発現させた心筋細胞では、さらに有意に活動電位持続時間が短縮し（ $P < 0.001$ ）、活動電位プラトー相（第 2 相）の loss を認めた。野生型チャネルの過剰発現系			

では、内向き整流性が保たれているため、脱分極時に外向き K 電流が減少する。そのため、Kir2.1 電流が増加することにより活動電位持続時間が短縮するが、活動電位プラトー相は保たれていると推察された。一方、野生型と変異チャネルを過剰発現させた心筋細胞では、脱分極時にも外向き K 電流が流れ続けるため活動電位持続時間はさらに短縮し、活動電位プラトー相がほぼ消失すると考えられた。 QT 短縮症候群患者において新規 <i>KCNJ2</i> 遺伝子異常、M301K ヘテロ変異を検出した。機能解析の結果、M301K 変異チャネルのみ発現させた細胞では機能的な Kir2.1 電流を認めなかったが、野生型と同変異チャネルを共発現させた細胞では Kir2.1 電流の内向き整流性が障害され、Kir2.1 電流の機能亢進を示した。これにより、活動電位持続時間が短縮し、QT 短縮を示すと推測された。この Kir2.1 電流における内向き整流性の障害による機能亢進は、<i>KCNJ2</i> 遺伝子異常が QT 短縮症候群を引き起こす新たな機序であると考えられた。
(論文審査の結果の要旨) QT 短縮症候群は、心電図上、QT 間隔短縮を特徴とし、突然死を引き起こす難治性心疾患として近年注目されている。原因として数種類のイオンチャネルの遺伝子異常が報告されているが発症機序には不明な点が多い。本研究では QT 短縮症候群と診断された 8 歳女児において原因遺伝子を検索した。 末梢血よりゲノムを抽出し、高速液体クロマトグラフィーを用いた候補遺伝子解析の結果、新規遺伝子変異 <i>KCNJ2</i>-M301K ヘテロ変異を検出した。 ヒト胎児腎 (HEK 293) 細胞に同遺伝子変異を発現させ、その電流変化をパッチクランプ法にて検証した。<i>KCNJ2</i>-M301K のみ発現させた細胞では機能的な電流が形成されず、野生型と M301K を共発現させた細胞では内向き整流性が障害されていた。M301 におけるアミノ酸残基の電荷を変化させ同様の機能解析を行うことにより、その電流変化が同部位におけるアミノ酸残基の電荷の変化 (中性→正電荷) と関連していることが示唆された。 次に、この電流の変化による活動電位の変化を検証するため、新生児ラット単離心室筋細胞に野生型 <i>KCNJ2</i>、または、変異チャネルを過剰発現させ、活動電位を記録した。その結果、野生型と変異チャネルを同量過剰発現させた心筋細胞では有意に活動電位持続時間が短縮していた。このため本患者では QT 時間が著明に短縮していると推察された。
以上の研究は、<i>KCNJ2</i> 遺伝子変異、M301Kに起因するI_{K1}電流変化の機序を解明し、QT短縮症候群の病態解明に大きく貢献すると考えられる。 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 24 年 3 月 6 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。