

氏 名 福本 大介

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博士甲第798号

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項

学 位 授 与 年 月 日 平成30年 3月 9日

学 位 論 文 題 目 Novel intracellular transport-refractory mutations in KCNH2 identified in patients with symptomatic long QT syndrome

(有症候性QT延長症候群症例に同定された細胞内輸送障害を引き起こす新規KCNH2変異)

審 査 委 員 主査 教授 勝山 裕

副査 教授 三浦 克之

副査 教授 江口 豊

## 論 文 内 容 要 旨

※整理番号	<b>805</b>	(ふりがな) 氏 名	ふくもと だいすけ 福本 大介
学位論文題目	Novel intracellular transport-refractory mutations in <i>KCNH2</i> identified in patients with symptomatic long QT syndrome (有症候性 QT 延長症候群症例に同定された細胞内輸送障害を引き起こす新規 <i>KCNH2</i> 変異)		
<p><b>【目的】</b></p> <p>先天性 QT 延長症候群 (LQTS) は心電図上、QT 間隔の延長を示し、多形性心室頻拍により失神や突然死を引き起こす遺伝性疾患である。先天性 LQTS の責任遺伝子は現在までに 16 種類報告されている。そのうち <i>KCNH2</i> は電位依存性 Kv11.1 チャネルの <math>\alpha</math> サブユニットをコードし、Kv11.1 チャネルは遅延整流カリウム電流の速い成分 (<math>I_{Kr}</math>) を構成する。<i>KCNH2</i> の機能喪失型変異は <math>I_{Kr}</math> を減少させ、先天性 LQTS 2 型を引き起こす。本研究の目的は、滋賀医科大学呼吸循環器内科の遺伝性不整脈のデータベースに登録されている先天性 LQTS 症例のうち、現在まで報告のない新規 <i>KCNH2</i> ミスセンス変異が同定された症例を選び、変異型チャネルの機能解析により病態を解明することである。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>滋賀医科大学呼吸循環器内科の遺伝性不整脈のデータベースに登録されている遺伝子解析を施行された先天性 LQTS 症例のうち、現在まで報告のない新規 <i>KCNH2</i> ミスセンス変異が同定された症例を選んだ。家族歴を有する血縁関係のない 3 家系の症候性 LQTS 症例を選び、同定された 2 種類の新規 <i>KCNH2</i> ミスセンス変異の機能解析を行った。CHO 細胞にチャネルを発現させ、ホールセルパッチクランプ法により <math>I_{Kr}</math> を記録した。また、野生型および変異型チャネルの細胞内局在を評価するため、チャネルを発現させた HEK 細胞を用いて免疫染色を行い、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。さらに変異型チャネルをレスキューする目的で、低温培養、E-4031 および dofetilide を用いた。</p> <p><b>【結果】</b></p> <p>本研究で機能解析を行った新規 <i>KCNH2</i> ミスセンス変異は p.G785D (c.2354g&gt;a) と p.T826I (c.2477c&gt;t) で、前者は 1 家系に、後者は残りの 2 家系に同定された。機能解析の結果、いずれの変異型チャネルもホモ接合型では非機能性で、ヘテロ接合型では野生型と比べて電流密度が半減した。G785D 変異型チャネル (Kv11.1-G785D) のヘテロ接合型では野生型と比べて、活性化曲線がポジティブシフトを、不活性化曲線が</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を用いて印字すること。

2. ※印の欄には記入しないこと。

ネガティブシフトを示し、脱活性化が遅いという結果であった。一方、T826I 変異型チャンネル（Kv11.1-T826I）のヘテロ接合型では野生型と比べて特性に変化を認めなかった。免疫染色および共焦点レーザー走査顕微鏡を用いた観察の結果、いずれの変異型チャンネルもホモ接合型は細胞膜に発現せず、主に小胞体内に滞留していた。低温培養を行ってもホモ接合型 Kv11.1-G785D は細胞膜に発現しなかったが、ホモ接合型 Kv11.1-T826I は発現した。低温培養によるホモ接合型 Kv11.1-T826I の細胞膜へのレスキューについては、機能解析で  $I_{Kr}$  を記録できたことから確認できた。低温培養以外に E-4031 と dofetilide を用いて機能解析を行ったが、いずれの変異型チャンネルもレスキューされなかった。

#### 【考察】

機能解析の結果、いずれの変異も機能喪失型であることが示された。ヘテロ接合型 Kv11.1-G785D の脱活性化は野生型と比べて遅かった。脱活性化時間が延長すると、再分極相において外向き電流が増加し、結果として QT 間隔が短縮する。しかし、ヘテロ接合型 Kv11.1-G785D では野生型と比べて活性化曲線がポジティブシフトを、不活性化曲線がネガティブシフトを示し、さらに電流密度も減少したことから、再分極相における正味の外向き電流は減少し、QT 間隔が延長すると考えられた。一方、ヘテロ接合型 Kv11.1-T826I は野生型と比べてチャンネルの特性に変化を認めなかった。免疫染色および共焦点レーザー走査顕微鏡を用いた観察の結果、いずれの変異も Kv11.1 チャンネルの細胞内輸送障害を引き起こすことが示された。さらに低温培養によってホモ接合型 Kv11.1-T826I の細胞内輸送がレスキューされることが、機能解析と免疫染色の双方から示された。一方、ホモ接合型 Kv11.1-G785D は低温培養によってレスキューされなかったことから、Kv11.1-T826I とは異なるメカニズムが Kv11.1-G785D に存在することが示唆された。3人の発端者は類似した表現型を持つが、2種類の変異型チャンネルは特性と低温培養に対する反応性において相違を認めた。更なる研究によって機序が解明され、治療の進歩につながることを期待される。

#### 【結論】

2種類の新規 *KCNH2* ミスセンス変異は、Kv11.1 チャンネルの細胞内輸送障害を引き起こすことが示された。チャンネルの特性については、野生型と比べて G785D 変異型では変化を認めたが、T826I 変異型では変化を認めなかった。低温培養を行っても Kv11.1-G785D の細胞内輸送はレスキューされなかったが、Kv11.1-T826I はレスキューされた。いずれの変異も機能喪失型であり、変異保持者の表現型を形成することが示された。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	805	氏名	福本 大介
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(LQT)は失神や突然死を起こす原因となる遺伝性疾患である。本研究では遺伝性不整脈データベースに含まれる新規 KCNH2 カリウムチャネル遺伝子のミスセンス変異について解析を行った。</p> <p>1. データベースから 3 家系で KCNH2 遺伝子にアミノ酸置換を生じる変異を見出した。家系 1 ではアミノ酸置換 G785D が生じていた。家系 2 と家系 3 では同じアミノ酸塩基置換(T826I)が生じていた。</p> <p>2. 変異 KCNH2 を CHO 細胞に強制発現させ、パッチクラップを行ってもカリウム電流は記録できなかった。野生型 KCNH2 と同時に発現させることでヘテロ変異状態を再現すると、野生型ホモ状態に比べて電流が減少した。G785D 変異と T826I 変異は野生型分子に与える影響のキネティクスが異なっていた。</p> <p>3. 変異 KCNH2 は ER に集積し細胞膜へは輸送されなかったが、T826I 変異では培養温度を下げることで細胞膜への移送がみられた。この結果と一致して、T826I を発現させた細胞で温度を下げるカリウム電流が記録された。薬理学的操作では変異体の機能を回復させることはできなかった。</p> <p>以上、2 つの変異はタンパク質一次構造上の近傍にあるが、分子機能に異なった影響を与えていることが示された。本研究は、変異分子の生理学的解析が本疾患治療法開発に有効であることを示しており、博士（医学）の学位論文に値するものと認められた。</p> <p>(総字数 595 字)</p> <p>(平成 30 年 2 月 1 日)</p>			