

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)	氏名	竹田 育子
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論 文 題 目			
Autosomal recessive Andersen-Tawil syndrome with a novel mutation L94P in Kir2.1 (Kir2.1 に新規ミスセンス変異 (L94P) を認める常染色体劣性遺伝形式の Andersen-Tawil 症候群)			
論文審査担当者			
主 査	教授	酒井 規雄	印
審査委員	教授	小林 正夫	
審査委員	教授	橋本 浩一	
〔論文審査の要旨〕			
<p>Andersen-Tawil 症候群 (ATS) は周期性四肢麻痺、心室性不整脈、形態異常を 3 徴とする稀な疾患である。ATS は内向き整流カリウムチャンネル Kir2.1 をコードする <i>KCNJ2</i> の dominant negative 変異を原因とし、通常は常染色体優性遺伝形式を示す。本研究において申請者は常染色体劣性遺伝が示唆される c. 281T>C の変異を有する ATS の家系を見出し、Kir2.1 の機能解析を通じてその発症機序を解析した。</p> <p>予め遺伝子研究に関して十分な説明を行い、同意を得た後、患者および症状のない母親、兄の DNA を白血球より抽出し、<i>KCNJ2</i> の DNA シークエンスを行った。家系についての詳細な情報が得られないため両親の血縁関係を確認する目的で、CytoScan HD Array を用いて患者染色体のホモ接合性を検討した。また、機能解析のため非罹患者と患者からそれぞれ Wild type の Kir2.1 チャンネル (WT)、L94P を有する変異型 Kir2.1 チャンネル (L94P) をコードする遺伝子をサブクローンし、WT-Enhanced green fluorescent protein (EGFP)、L94P-EGFP</p>			

と WT 用発現ベクターを作成、これらを各種培養細胞にトランスフェクトし、以下の実験を行った。細胞内局在に関しては HEK293 細胞を用いて蛍光染色を行い、phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) を細胞膜の指標とし、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。更に Plasma membrane sheet assay で HEK293 細胞の細胞膜を抽出し、ウエスタンブロット法で Kir2.1 の膜での発現量を検討した。最後に CHO 細胞を用いたパッチクランプ法にて K チャネルの特性を評価した。全細胞記録でイオン電流を記録し、-150 mV から +60 mV へ膜電位を変化させ、チャネルの電流-電圧特性を解析した。WT と L94P を共発現した細胞の解析には発現ベクターとして L94P-EGFP と WT を用いた。統計学的手法は Dunnett 法を用い、有意水準 5%とした。

結果は以下のようにまとめられる。新規遺伝子変異 c. 281T>C が患者はホモ接合体で、母親はヘテロ接合体で認められた。患者では第 17 染色体上に *KCNJ2* を含む 11.4 Mb に及ぶホモ接合部位を認めた。また 5 Mb 以上のホモ接合部位が常染色体全体の 3.4%を占めており、両親の血縁関係が示唆された。蛍光染色では WT-EGFP は PIP2 と共局在しており、細胞膜表面に高い発現が認められたが、L94P-EGFP は主に細胞内に局在し、細胞膜表面ではわずかに発現しているのみであった。一方、L94P-EGFP と WT を共発現させた細胞では L94P-EGFP も膜へ移行した。HEK293 細胞の蛍光強度を測定したところ、WT-EGFP と L94P-EGFP+WT は膜に強いシグナルを認めたが、L94P-EGFP 単独では膜でのシグナルは低下していた。膜分画を用いたウエスタンブロット法においても L94P が WT や L94P+WT と比べて発現量が低下していた。パッチクランプ法では、L94P (-332.9 ± 47.9 pA, $n=16$) は L94P+WT (-1482.6 ± 304.1 pA, $n=16$) や WT (-2217.4 ± 337.4 pA, $n=16$) と比べ、有意に内向き電流が低下していた ($p < 0.001$)。

以上の結果から、本論文は Kir2.1 ヘテロ 4 量体は膜移行性・チャネル機能ともに保たれるものの、ホモ接合体では Kir2.1 の膜移行性が低下し、細胞膜における Kir2.1 の発現が減少することにより ATS を発症したと推定された。本知見は常染色体劣性遺伝形式を呈する一部のチャネルopathy の発症機序を普遍的に説明しうるものと考えられ、臨床神経内科学の発展に大いに貢献するものと判断された。よって審査委員会委員全員は、本論文が申請者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。