

依頼稿 (報告)

平成 23 年度「独創性のある生命科学研究」プロジェクト型研究課題 イオンチャネル遺伝子迅速解析新規システムの構築と チャネロパシー診断・治療への応用

宮 津 基* 野 口 智 弘** 佐 藤 伸 之*** 丹 保 亜希仁****
高 井 章* 柏 柳 誠** 長谷部 直 幸*** 岩 崎 寛****

[研究の背景]

イオンチャネルの異常によってある種の疾病が引き起こされる (チャネロパシー)。心臓突然死を引き起こす致死性不整脈が、心筋細胞膜のイオンチャネル遺伝子の先天性の変異によることがよく知られている。一方、薬剤や徐脈などの後天性 (二次性) の不整脈の原因としてチャネル遺伝子の変異がその素因となる例も報告されて、従来、複数の外的要因 (電解質代謝異常や自律神経トーン等) の組合せにより引き起こされたと考えられてきた心血管疾患やその他の頻度の高い疾病が、実はその背景としてイオンチャネル遺伝子異常を含むことが分かってきた。これらの遺伝的要因を迅速に特定することは、個々の疾病に対する診断・治療にとって極めて重要である。更に、これらイオンチャネル遺伝子変異がどの様に不整脈の素因として関与しているかについてはイオンチャネルに対する機能評価システムを用いて検討する必要がある。

[目 的]

本研究計画は、イオンチャネル遺伝子の配列変異と病態との関連の評価を、迅速かつ確実に行うシステムを構築し、各種チャネロパシーの診断法と新しい治療法の開発への展開を図る。

[目 標]

プロジェクトの意図するところは、イオンチャネルに関係する研究を推進している基礎系 2 講座と臨床系 2 講座とが密接に連繋して、総合研究棟改修後の施設のメリットを最大限に活用しながら、イオンチャネルの構造的・機能的解析のための共同実験システムの構築を目指すものである。それにより、国際レベルのチャネロパシーの新しい診断 / 治療法の研究拠点を形成することを目標とする。

[研究成果]

(1) イオンチャネル遺伝子迅速解析システムの構築

まず、2つの生理学講座が中心になって、本プロジェクトの基盤となる解析システムの整備と臨床例への応用のための最適化について検討した。今回のプロジェクトでは、チャネロパシーの原因となる遺伝子変異の同定が必須の作業となる。その際、スクリーニングで認められた遺伝子変異が当該疾患と実際に関与するものか、目立った形質変異をもたらさないサイレントな遺伝子多型に過ぎないのかを鑑別する必要がある。そのためには、正常遺伝子に検出された変異配列を入れ込んだものを培養細胞に発現させ、電気生理学的方法によりチャネルの性質の変化の有無を検出することが基本的ルーティーンとして必須である。これに関し、生理学講座自律機能分野では、目下「緑内障治

*旭川医科大学 生理学講座自律機能分野 **生理学講座神経機能分野

内科学講座 循環・呼吸・神経病態内科学分野 *麻酔・蘇生学講座

療の標的としての伝達物質作動性陽イオンチャネルの同定と機能解析」を遂行し、眼内平滑筋に於いて代謝型受容体を介して活性化される陽イオン選択性チャネルを電気生理学的手法により同定した。また、この分子本体候補である Transient Receptor Potential (TRP) チャネルファミリーの Canonical タイプの数種類が発現していることを遺伝子、蛋白質レベルでそれぞれ確認した。TRPC1, TRPC4 チャネル遺伝子のクローニングに関しては現在進行中であり、今後哺乳類の発現プロモーターにこれらのチャネル遺伝子を挿入し、培養哺乳細胞の一つである CHO 細胞を用いた異所発現系を使用してその機能解析を遂行していく予定である。上記とは別に、心肥大の誘導に関与し心不全治療の新たな創薬標的となり得ると考えられている TRPC3, TRPC6 チャネル遺伝子ノックアウトマウスの心筋細胞におけるチャネル解析についても検討していく予定である。

生理学講座神経機能分野では、「嗅覚障害治療の標的としての TRP チャネル蛋白質の同定と機能解析」を推進した。具体的には、通常末梢の体性感覚神経に発現し機械刺激（細胞膨張や膜伸展）や侵害性熱刺激（ $> 52^{\circ}\text{C}$ ）等によって活性化される Ca^{2+} 透過性チャネルの分子本体である TRPV2 チャネルが、マウス嗅上皮の新生嗅神経の軸索に特異的に局在することを明らかにした。また、急性単離した嗅神経において、TRPV2 チャネルアゴニストは細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させたことから、機能的な TRPV2 チャネルが嗅神経に存在することが明らかとなった。これらの結果は、TRPV2 チャネル、及びそれを介した細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が嗅神経軸索の伸長に関与する可能性を示唆し、TRPV2 チャネルが嗅覚障害治療の新たな標的となり得るだけでなく、TRPV2 チャネルの機能解析が神経再生および神経機能再建への突破口となることも期待される。

これらの研究を通じ、われわれは上記のイオンチャネルに対する機能解析等の基本的ルーティーンに高度に習熟することが出来た。今後、臨床例の解析を迅速に進めるための作業の最適化を目指せばよい段階となった。

(2) 臨床検査からチャネルパシー診断へ

臨床系のグループである内科学（循環内科学/呼吸

/神経病態内科学）では、臨床の視点から「非侵襲的心電図指標を用いた致死的不整脈患者のリスク層別化に関する検討」という内容について、日常的に行われる臨床検査から新規心電図指標の有用性について検討し、致死的不整脈の non-invasive marker の確立を試みた。具体的には、これまで心疾患や不整脈患者の予後予測には心拍変動解析が用いられてきたが、近年、ホルター心電計を用いた QT 動態が心疾患患者のリスク層別化に、より有用である可能性が示唆されていたこと、最近、心電図上の Tpeak-Tend (Tp-e), Tp-e/QT ratio が心筋再分極過程の不均一性を反映する新しい非侵襲的な心電図リスク指標として注目を集めていたことから、これらの新しい心電図指標が、J 波症候群（特発性心室細動患者の代表疾患である Brugada 症候群と、J 波を呈する早期再分極症候群をまとめたもの）のリスク層別化に役立つか否かを検討した。その結果、心内膜と心外膜における再分極過程の不均一性を反映するとされる Tp-e と Tp-e/QT は、心室細動を合併した J 波症候群で有意に増大しており、本疾患のリスク層別化に有用である可能性を明らかにした。

麻酔・蘇生学講座では「ミトコンドリアイオンチャネル分析に基づく吸入麻酔薬の心筋保護作用のメカニズム解析と事前評価法の確立」という内容で、心筋保護作用を示すことが知られている isoflurane などの吸入麻酔薬の心筋における作用機構を明らかにするためのシステムの構築に取り組んだ。今後、モルモット心筋から単離したミトコンドリア内膜 (mitosome) における膜電位固定法による電流記録実験を行い、ミトコンドリア内膜に存在する Ca^{2+} 依存性 K チャネル、ATP 感受性 K チャネルに注目し isoflurane の効果をさらに直接的に検討する予定である。

[今後の展開]

日本では年間 6 万人の心臓突然死患者の発生が推計され、その原因として不整脈死が大きな割合を占めるものと推察されている。致死的不整脈の中でも、我が国では、いわゆる特発性心室細動患者の頻度が高く、その代表疾患である Brugada 症候群のスクリーニングとリスク層別化が大きな問題となっている。Brugada 型心電図波型は健診受診者の約 0.5% に認められるが無症候性と症候性の鑑別点は未だ十分に明らかにされていない。一方、これまで正常型と考えられてきた

早期再分極症候群の中にも、心室細動発作を起こす症例の存在が近年報告され、 K_{ATP} チャネルの異常が原因遺伝子の一つとして同定された。この早期再分極症候群の波形も一般人口の約 5-10% に認められるため、両者の心電図波型から突然死予備群をいかに見つけ出すかが重要課題となっていた。

今回、内科学グループが明らかにした新規心電図指標による心室細動症例における $T_{peak-Tend}$ (T_{p-e})、 T_{p-e}/QT ratio の増大所見は、潜在的なチャネロパシーを反映しているものと推察され、今後患者検体を用いた遺伝子解析を行うことにより、病態へのさらなるアプローチが可能になると同時に、非侵襲的に行われる臨床診断からチャネロパシー診断への突破口を与えるものと期待される。

Brugada 症候群と確定した症例の約 2 割に Na チャ

ネル遺伝子 ($SCN5A$) の異常が報告されていることから、遺伝子解析を実際におこなうときには $SCN5A$ を第一標的としてその変異の有無を検討していく。その他、Ca チャネル ($CACNA11C$)、複数の K チャネルの遺伝子についてそれらの変異の有無を確定する必要がある。

チャネル遺伝子の変異が同定できた場合、次の過程として、その変異によってどのようにチャネルの機能が損なわれるのかについて詳らかに解析することが必要となる。最終的には、チャネル機能異常による心筋細胞の活動電位波形への影響と致死的不整脈発生機序を明らかにし、J 波症候群等の致死性不整脈に対する効果的な治療法の開発に活用していきたいと考えている。