

論文要約

Latent pathogenicity of the common G38S polymorphism of
KCNE1 K⁺ channel modulator

(K⁺チャンネルを調節する KCNE1 の頻度の多い遺伝子多型、G38S の
潜在的な病原性について)

富山大学大学院

医学薬学研究部生命・臨床医学専攻
第二内科講座

氏名 山口 由明

【研究の目的】

心室筋の活動電位は、主に Na, K, Ca イオンチャネルで形成されている。この中の遅延整流 K⁺チャネルは心室筋の再分極形成に関与している。

KCNE1 遺伝子は K⁺チャネルの β サブユニットを発現し、 α サブユニットである KCNQ1 とともに遅延整流 K⁺電流の遅い成分である I_{Ks} を、KCNH2 とともに速い成分の I_{Kr} を調節し、心室筋活動電位の再分極を形成する。この KCNE1 遺伝子の変異は、QT 延長症候群 (LQT5) を起こすとされている。また、この遺伝子の低頻度の単一塩基多型 (D85N) は、KCNH2 チャネル機能を修飾し疾患感受性に影響すると近年報告された。本研究ではこの KCNE1 遺伝子の G38S というアミノ酸置換を起こす G112A という単一塩基多形 [KCNE1 (G38S)] に注目した。

KCNE1 (G38S) は、ヘテロの頻度が 6.6-45% と民族間に差があるものの比較的頻度が多い単一塩基多型である。KCNE1 (G38S) の QT 間隔への関与については、QT 間隔を軽度延長させるという報告やこの遺伝子と QT 間隔は関係がないとの報告など様々である。QT 間隔は先行する RR 間隔の影響を受けるため、これまで補正式 [QTc (Bazett の補正式 = QT/\sqrt{RR})] が用いられていた。しかし、頻脈時や徐脈時に十分に補正されないとの報告があり、近年は QT-RR 関係で評価することが有用とされている。また、QT 間隔が正常もしくは軽度の延長であっても、薬剤、電解質異常を契機に QT 間隔が延長し、torsade de pointes という特徴的な致死性心室性不整脈を起こすとの報告もあり、本研究では KCNE1 (G38S) が QT 延長症候群の発症に関与するか *in vivo* と *in vitro* で検討した。

【方法】

QT 延長症候群が疑われ、富山大学附属病院を受診した 45 例を対象とした。倫理審査委員会の承認を受け、インフォームドコンセントを行った上で遺伝子検査を行った。遺伝子検査は、QT 延長症候群の中で頻度の多い LQT1、LQT2、LQT3 の原因遺伝子である KCNQ1、KCNH2、SCN5A に加え、 I_{Ks} 、 I_{Kr} に影響を与える LQT5 と LQT6 の原因遺伝子である KCNE1、KCNE2 をダイレクトシーケンス法で行った。

遺伝子検査で KCNE1 (G38S) を有し、遺伝子変異やアミノ酸置換を伴う他の単一塩基多型を認めなかった 4 例に、24 時間ホルター心電図を施行し QT-RR 関係を検討した。残りの 41 例中、遺伝子検査と Shimizu らのプロトコールに従ったエピネフリン負荷試験で診断した LQT1 9 例、LQT2 8 例と QT 間隔が正常で基礎心

疾患のない健常群 16 例の 3 群と比較した。

ホルター心電図を用いた QT-RR 関係の解析では、各患者において QT-RR 関係を一次回帰直線に近似し、その傾き、切片、RR 間隔 600, 1200 ms での QT 間隔 (QT_{600} , QT_{1200}) を比較した。

In vitro の検討として、KCNE1 (G38S) を組み込んだプラスミドを、KCNH2 または KCNQ1 とともに HEK-293T 細胞に発現させ、ホールセルパッチクランプ法により、KCNH2 チャネルおよび KCNQ1 チャネルに対する KCNE1 (G38S) の機能解析を行った。

心筋細胞におけるイオンチャネルの評価のため、細胞外溶液温度を 37°C 前後に維持し 2 段階電圧固定法 (V_{first} , V_{second}) で測定した。再分極の電流を評価するため、KCNH2 チャネルおよび KCNQ1 チャネルの tail current の電流量、電流-電圧曲線にボルツマン方程式から求めた電位依存性、および deactivation として tail current の下降相の時定数 (τ) を、KCNE1 (G38S) と野生株との比較および KCNE1 (G38S) と野生株の共発現と野生株で比較した。

それに加え、KCNH2 チャネル電流に対しては、選択的 I_{Kr} ブロッカーの E4031 (30 nM) による電流量減少の程度や細胞外 K 濃度の変化 (5.4 vs. 3.0 mM) での recovery from inactivation および deactivation の活性を、時定数 (τ) を用いて KCNE1 (G38S) と野生株で比較した。

【結果】

KCNE (G38S) 群の患者背景

QT 延長症候群が疑われた 45 例のうち、15 例に KCNE1 (G38S) を認めた。そのうち、遺伝子変異やアミノ酸置換を伴う他の単一塩基多型を持たない患者は 5 名であった。そのうち 1 例は心房細動であったため本研究から除外し、残りの 4 例を KCNE1 (G38SS) 群とした。2 例に運動後の失神歴を認め、そのうち 1 例は妹が運動後に突然死した家族歴を有していた。2 例にエピネフリン負荷を施行し、2 例とも LQT2 と同様の変化がみられた。KCNE1 (G38S) 群の QTc (467 ± 14 ms) は遺伝子検査とエピネフリン負荷試験で診断された LQT1 群 (464 ± 14 ms)、LQT2 群 (464 ± 14 ms) と同様に健常群 (402 ± 21 ms) よりも有意に延長していた ($P < 0.05$)。失神歴に KCNE1 (G38S) 群、LQT1 群および LQT2 群の間に有意差はなかった。

QT-RR 関係

KCNE1 (G38S) 群の QT-RR 関係の傾き (0.215 ± 0.021) は、LQT2 群 (0.207 ± 0.032) と同様に健常群 (0.135 ± 0.025 , $P < 0.001$)、LQT1 群 (0.168 ± 0.022 , $P < 0.01$) より有意に増大していた。QT-RR 関係の切片は 4 群で差がみられなかった。KCNE1 (G38S) 群の QT_{600} , QT_{1200} (374 ± 15 and 503 ± 24 ms) は LQT1 群 (379 ± 21 and 479 ± 23 ms)、LQT2 (364 ± 23 and 488 ± 29 ms) 群と同様に健常群 (338 ± 11 and 419 ± 16 ms) より有意に延長し ($P < 0.01$ and $P < 0.001$)、徐脈時にその傾向が顕著であった。KCNE1 (G38S) 群、LQT1 群、LQT2 群において QT 間隔に差はみられなかった。

パッチクランプによる KCNE1 (G38S) の機能解析

パッチクランプ法による KCNE1 (G38S) の機能解析においては、baseline = -80 mV, $V_{\text{first}} = -60 \sim +60$ mV, $V_{\text{second}} = -60$ mV の条件下で測定を行い、KCNE1 (G38S) は $V_{\text{first}} > -20$ mV で KCNH2 チャネル電流量を低下させ、0 mV で最大 34% 低下させた (71.8 ± 9.2 pA/pF vs. 109.0 ± 12.6 pA/pF, $P < 0.05$)。KCNE1 (G38S) と野生株の共発現では KCNH2 電流の低下の程度が減弱した。

また、KCNH2 チャネルブロッカーの E4031 に対して KCNE1 (G38S) の電流の減少率が野生株と比べ有意に増大した ($61.7 \pm 6.7\%$ vs. $41.2 \pm 7.2\%$, $P < 0.05$)。細胞外 K^+ 濃度が低下すると野生株と比べ KCNE1 (G38S) は inactivation gate における recovery from inactivation の時定数の低下 (12.8 ± 0.4 ms vs. 14.1 ± 0.8 ms, $P < 0.05$) を認めた。

KCNQ1 チャネル電流量は baseline = -80 mV, $V_{\text{first}} = -50 \sim +80$ mV, $V_{\text{second}} = -50$ mV の条件下測定を行い、KCNE1 (G38S) は野生株と比べ有意差はなかったが、電位依存性の低下を認めた (-4.72 ± 2.36 mV vs. $+8.30 \pm 3.14$ mV, $P < 0.01$)。KCNE1 (G38S) と野生株の共発現では KCNQ1 チャネルの電位依存性の低下の程度が減弱した。

【考察】

先行する RR 間隔の影響を受ける QT 間隔の評価として、Bazett を含む様々な補正式が報告されたが、徐脈時および頻脈時に変動が大きく確立された補正式は定まっていない。これに対して、QT-RR 関係は RR 間隔に対する QT 間隔の変動を dynamic に評価できるため有用であるとの報告がある。さらに、QT 延長症候

群と健常群で QT-RR 関係を比較し、QT 延長症候群の QT-RR 関係の傾きが増大したとの報告もあり、QT 延長症候群の再分極異常の評価にも有用であった。本研究のホルター心電図から解析した KCNE1 (G38S) 群の QT-RR の傾きは、LQT2 群と同様に健常群と LQT1 群と比較し増大していた。このことから、KCNE1 (G38S) 群は LQT2 群と同様に、徐脈時の QT 間隔の延長の程度が健常群より増大するという再分極異常がみられた。

HEK-293T 細胞に発現させた機能解析で、KCNE1 (G38S) は KCNH2 チャネル電流量の低下と KCNQ1 チャネルの電位依存性の低下を認め、KCNE1 (G38S) は心筋の再分極に関係すると考えられた。電気生理検査ではヘテロの状態を完全に再現することはできないが、野生株との共発現で KCNE1 (G38S) のみの 2 つのチャネルへの変化が減弱した。このことから KCNE1 (G38S) は KCNH2 および KCNQ1 チャネル電流を低下させ、ヘテロではその影響が減弱する可能性が示唆された。

本研究の KCNE1 (G38S) のチャネルへの KCNH2 および KCNQ1 チャネルへの影響はこれまでの報告された遺伝子異常と比べ軽微である。しかし、我々は KCNE1 (G38S) を有する患者が、QT 間隔を延長させる要因である QT 間隔を延長させる薬剤や低 K 血症を契機に、torsade de pointes を起こした例を経験し、QT 間隔を延長させる因子が負荷されることで QT 間隔が急激に延長するとの報告もあった。このような症例では、通常単一チャネル電流が低下しても同じ作用を示す他のチャネルで電流低下を補うという repolarization reserve の閾値が、低いと考えられている。そこで、我々は QT 間隔を延長させる薬剤や K 濃度変化での電流量の変化を検討し、KCNE1 (G38S) に KCNH2 チャネルブロッカーに対する感受性の亢進や、細胞外 K⁺濃度低下に対する inactivation gate の変化の増強がみられた。このことから KCNE1 (G38S) は頻度の多い遺伝子多型であるにもかかわらず repolarization reserve の低下がみられ、QT 延長を来す薬剤の投与や低 K 血症では、QT 間隔の延長による致死的不整脈を起こす可能性があると考えられた。

【総括】 KCNE1 (G38S) に対する *in vivo* と *in vitro* での潜在的な病因を認め、QT 間隔を延長させる要因(薬剤、低 K 血症)で再分極異常が増強する可能性が考えられた。