

# 大野原岳史 学位論文審査要旨

主 査 山 本 一 博  
副主査 久 留 一 郎  
同 西 村 元 延

## 主論文

Molecular mechanisms underlying the pilsicainide-induced stabilization of hERG proteins in transfected mammalian cells

(遺伝子導入哺乳類細胞におけるピルジカイニドにより誘導されたhERG蛋白の安定化の基礎となる分子機構)

(著者：大野原岳史、久留一郎、倉田康孝、Peili Li、野津智美、森川久未、大谷直由、吉田明雄、飯塚和彦、加藤克、三明淳一郎、二宮治明、檜垣克美、白吉安昭、西原孝、伊藤敏幸、中村嘉伸、西村元延)

平成28年 Journal of Arrhythmia DOI:10.1016/j.joa.2016.09.003

## 参考論文

1. Smooth muscle cell sheet transplantation preserve cardiac function and minimize cardiac remodeling in a rat myocardial infarction model

(平滑筋細胞シート移植はラット心筋梗塞モデルにおいて心機能を維持し、心臓リモデリングを極小化する)

(著者：原田真吾、中村嘉伸、白谷卓、藤原義和、岸本祐一郎、大野原岳史、大月優貴、岸本諭、山本康孝、久留一郎、西村元延)

平成28年 Journal of Cardiothoracic Surgery DOI:10.1186/s13019-016-0508-x

# 学 位 論 文 要 旨

Molecular mechanisms underlying the pilsicainide-induced stabilization of hERG proteins in transfected mammalian cells

(遺伝子導入哺乳類細胞におけるピルジカイニドにより誘導されたhERG蛋白の安定化の基礎となる分子機構)

ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子 (hERG) は心臓活動電位の再分極に重要な役割を果たす電位依存性カリウムチャネル電流 (IKr) の  $\alpha$  サブユニットをコードする遺伝子で、この遺伝子の変異はQT延長症候群2型 (LQT2) の原因となる。その機序は小胞体/ゴルジ体で成熟化できない変異hERG蛋白が過剰に分解されるために細胞膜上のhERG蛋白が減少するためであり、この変異hERG蛋白を成熟化させる方法が治療法として検討されている。

pilsicainideはVaughan Williams分類でclass Icに分類される選択的ナトリウムチャネル遮断薬であり、活動電位の再分極には関与しないとされているが、hERGチャネルに作用して、IKrを遮断し、活動電位の延長をもたらすという報告もある。これに対し、ウシやブタのプルキンエ細胞を用いた実験では、pilsicainideが活動電位を短縮させたという報告もある。これは本剤のhERG蛋白の安定化を介するIKrの増加が示唆される。しかしながら、pilsicainideが実際にhERG蛋白を安定化させるかという検討はされていない。

本研究では、hERG蛋白を発現した細胞にpilsicainideの急性/慢性投与を行い、pilsicainideの慢性投与が化学シャペロンを介してhERG蛋白を安定化させる効果を有することを明らかにしたので報告する。

## 方 法

野生型hERG、変異hERG遺伝子をそれぞれHEK293細胞に導入し、その細胞にpilsicainideの急性/慢性投与がhERG蛋白およびIKrに及ぼす影響をウエスタンブロット法、免疫蛍光抗体染色、パッチクランプ法を用いてそれぞれ検討した。

## 結 果

ウエスタンブロット法、パッチクランプ法の結果、pilsicainideの急性投与(10分間)ではhERG蛋白、IKrに作用しなかったのに対し、慢性投与(48時間)では濃度依存性にhERG蛋白、IKrの増加が認められた。

cycloheximideを用いたChase実験では、pilsicainide 3  $\mu$ Mを48時間添加すると、コントロールでのhERG蛋白の分解過程と比較して、分解過程が遅延することが明らかとなった。

また、免疫蛍光抗体染色と共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察の結果、hERG蛋白発現細胞の培養液中にpilsicainide 3  $\mu$ Mを48時間添加すると、hERG蛋白は細胞膜とともに局在しているシグナルが増加した。

この機序を解明すべく、細胞膜非通過型pilsicainideを用いて慢性投与の実験を行ったが、hERG蛋白、IKrの増加は認められなかった。また、pilsicainide慢性投与はAktのリン酸化やHeat shock proteinの発現にも関与していなかった。hERG蛋白の化学シャペロンとして知られるE4031を用いた実験にて、E4031 10  $\mu$ M及びpilsicainide 3  $\mu$ Mの慢性投与はそれぞれhERG蛋白の増加をもたらすが、E4031存在下ではpilsicainide慢性投与による効果はさらに増強されることはなかった。

## 考 察

pilsicainide慢性投与によるhERG蛋白安定化作用は化学シャペロンとして作用しているものと考えられた。pilsicainideの本作用は変異型hERG蛋白においても確認され、臨床応用の可能性も示唆された。

## 結 論

pilsicainideの慢性投与により、本剤は細胞膜を通過し、化学シャペロンとしてhERG蛋白に作用してこれを安定化させ、IKrを増加させる作用が明らかとなった。この機構は変異hERG蛋白の安定化にも寄与すると考えられた。