

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21082

研究課題名(和文) カテコラミン誘発多形性心室頻拍患者より検出した新規TRPM4遺伝子異常の検討

研究課題名(英文) A novel TRPM4 mutation identified in a patient with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia

研究代表者

服部 哲久 (Hattori, Tetsuhisa)

滋賀医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：80638932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：カテコラミン誘発性多形性心室頻拍は、交感神経緊張時に心室頻拍・細動を引き起こし、突然死の原因となる遺伝性疾患である。同疾患と診断された5歳男児より新規TRPM4遺伝子異常を検出し、電気生理学的機能解析を施行し、遺伝子変異によるTRPM4電流の変化を検討した。その結果、細胞内カルシウムイオンが $1\mu\text{M}$ では電流の変化を認めなかったが、 $10\mu\text{M}$ では低下を認めた。また、細胞膜でのチャネル発現量を比較したが、遺伝子変異による変化を認めなかった。これらの結果より、電流変化の原因として、遺伝子変異によりカルシウムイオン感受性が変化している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT) is an inherited arrhythmogenic disease characterized by adrenergically mediated ventricular tachyarrhythmias that cause sudden cardiac death. We identified a novel TRPM4 mutation in a five-year-old boy with CPVT. Electrophysiological analysis revealed small TRPM4 currents at a calcium concentration of $10\mu\text{M}$ in spite of no significant current changes at a lower concentration of $1\mu\text{M}$. Western blotting analysis showed no significant difference in plasma membrane expression between normal and mutant TRPM4 channels. These results indicate that the effect of the TRPM4 mutation is related to calcium sensitivity.

研究分野：内科系臨床医学

キーワード：分子心臓学 疾患関連遺伝子 チャネル 不整脈

1. 研究開始当初の背景

カテコラミン誘発多形性心室頻拍 (catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, CPVT) は、交感神経緊張時に二方向性あるいは多形性心室頻拍を誘発し、致死的不整脈を引き起こす遺伝性不整脈疾患であり、小児期の突然死の原因疾患として注目されている。現在まで、いくつかの原因遺伝子が明らかとなっており、CPVT 患者の約 50-60% に筋小胞体からのカルシウムイオン放出に関わるリアノジン受容体遺伝子異常が検出されるが、稀な疾患であり、遺伝的背景、機序は明らかにされていない。

2. 研究の目的

CPVT と診断された患者の遺伝子解析の結果、新規 TRPM4 遺伝子異常を検出した。これまで、CPVT の原因遺伝子として、TRPM4 遺伝子異常の報告はなく、疾患への影響、機序は不明である。そこで、CPVT 患者より検出した新規 TRPM4 遺伝子変異の機能解析を施行し、病態解明や治療への応用を模索する。

3. 研究の方法

(1) CPVT 患者背景

TRPM4 遺伝子異常を検出した症例は、5 歳男児で、涕泣時に多型性心室頻拍を認められた。遺伝子解析を施行した結果、既知の CPVT 原因遺伝子異常を検出せず、新規 TRPM4 遺伝子異常 (I1033N、ヘテロ接合体) を検出した。

(2) ホールセル・パッチクランプ

HEK 細胞 (Human embryonic kidney cell) に TRPM4 のプラスミドをトランスフェクションし、ホールセル・パッチクランプ法により TRPM4 電流を記録した。文献を参考にし、ガラス電極内カルシウムイオン $10 \mu\text{M}$ にて施行した。

(3) 細胞内カルシウムイオン濃度の検討

TRPM4 チャンネルは細胞内カルシウムイオンにより活性化されることが知られている。そのため、ガラス電極内カルシウムイオン濃度を $1 \mu\text{M}$ にして、(2)と同様に TRPM4 電流を記録した。

(4) 細胞膜での TRPM4 チャンネルの発現量

TRPM4 遺伝子異常による電流量変化の原因として、細胞膜でのチャンネルの発現量が異なっている可能性が考えられた。そのため、HEK 細胞に TRPM4 のプラスミドをトランスフェクションし、細胞膜に存在する TRPM4 チャンネルをピオチン標識し、ウェスタンブロット法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) ホールセル・パッチクランプ

ホールセル・パッチクランプ法により得られた結果を図 1、図 2 に示す。

図 1: 代表的な TRPM4 電流 (細胞内カルシウムイオン濃度: $10 \mu\text{M}$)

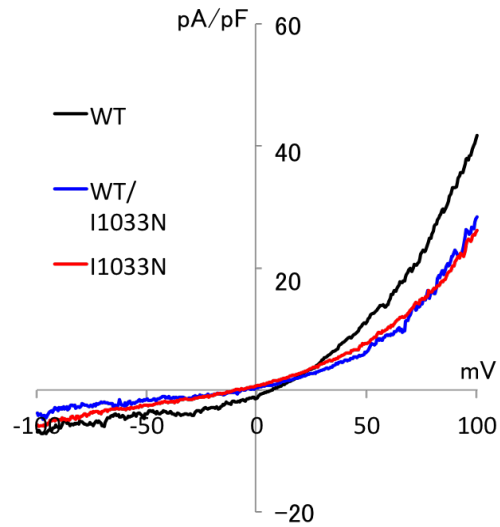
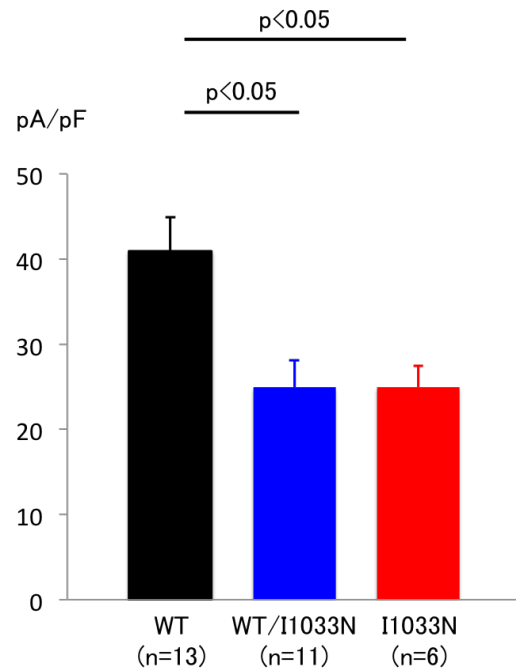


図 2: 100mV における各電流量の比較 (細胞内カルシウムイオン濃度 $10 \mu\text{M}$)



コントロールと比較して、ヘテロ、ホモいづれも電流の低下を認めた。

(2) カルシウム感受性

上記により得られた電流変化と細胞内カルシウムイオン濃度との関連について研究するため、細胞内カルシウムイオン濃度 $1 \mu\text{M}$ にて TRPM4 電流を記録した。その結果を図 3、4 に示す。

図3: 細胞内カルシウムイオン濃度 $1 \mu\text{M}$ における代表的な TRPM4 電流

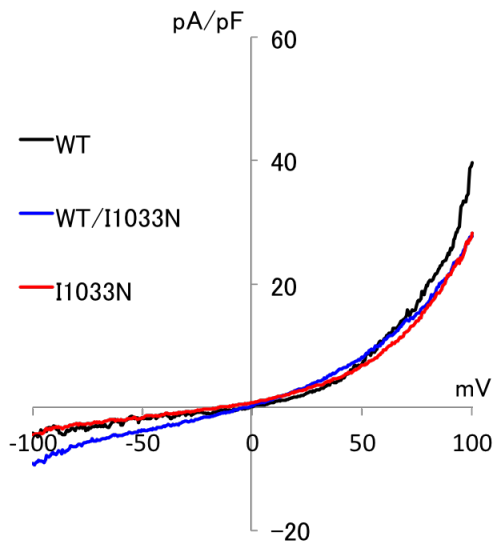
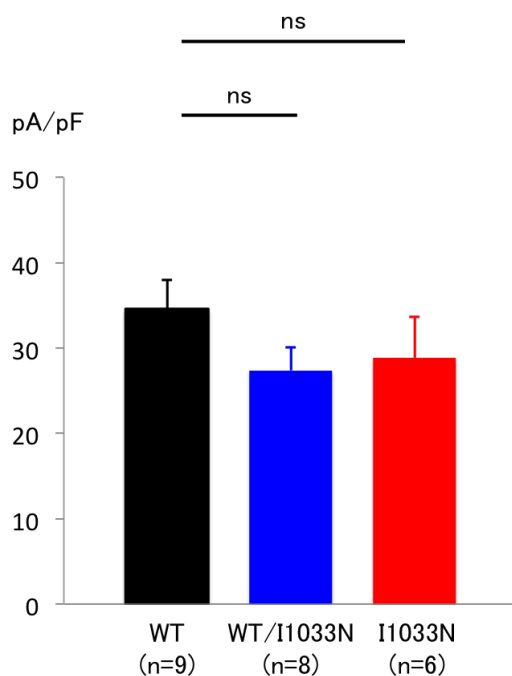


図4: 100mV における各電流量の比較 (細胞内カルシウムイオン濃度 $1 \mu\text{M}$)



統計解析を施行したが、TRPM4 電流量に有意差を認めなかった。

(3) 細胞膜での発現量
ウェスタンブロットの結果を図5、6に示す。

図5: 細胞膜でのチャンネルの発現量 (ウェスタンブロット)

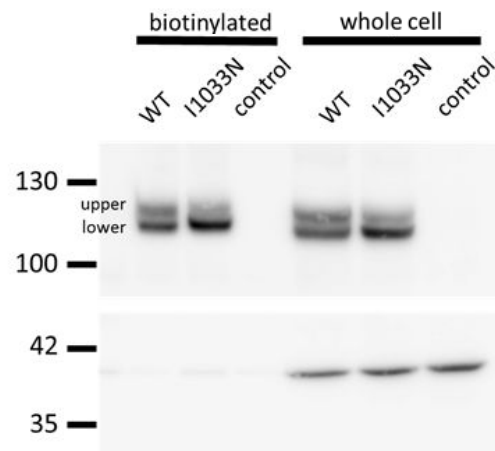
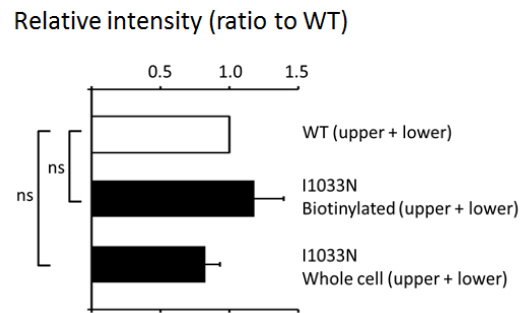


図6: 図5のバンド比較



コントロールと *TRPM4*-I1033N を解析、比較したところ、有意差を認めなかった。この結果より、(1)で得られた変異での電流量低下の原因として、細胞膜に存在する TRPM4 チャンネル量の低下は否定的と考えられた。

本研究にて、今回検出した TRPM4 遺伝子異常により、細胞内カルシウムイオン $1 \mu\text{M}$ では TRPM4 チャンネルの電流は変化を認めなかったが、 $10 \mu\text{M}$ では電流量が低下することが示唆されたため、カルシウムイオン感受性が変化している可能性が考えられた。また、この電流変化の原因として、細胞膜でのチャンネルの発現量の低下は否定的と考えられた。今回検出した TRPM4 遺伝子異常の患者の表現系は CPVT であったため、現在、カテコラミンの影響について研究しており、さらなる病態解明を進めている。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)
Kuroda Y, Yuasa S, Watanabe Y, Ito S, Egashira T, Seki T, Hattori T, Ohno S, Kodaira M, Suzuki T, Hashimoto H, Okata S,

Tanaka A, Aizawa Y, Murata M, Aiba T, Makita N, Furukawa T, Shimizu W, Kodama I, Ogawa S, Kokubun N, Horigome H, Horie M, Kamiya K, Fukuda K. Flecainide ameliorates arrhythmogenicity through NCX flux in Andersen-Tawil syndrome-iPS cell-derived cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, Volume 9, 2017, Pages 245-256, DOI: 10.1016/j.bbrep.2017.01.002

〔学会発表〕(計 2 件)

園田 桂子、大野 聖子、市川 麻理、服部 哲久、伊藤 英樹、牧山 武、堀江 稔 (4 番目)、Copy Number Variations of SCN5A in Brugada Syndrome、第 81 回日本循環器学会学術集会、金沢、3.17-3.19、2017

Y. Kuroda, S. Yuasa, Y. Watanabe, S. Ito, T. Egashira, T. Seki, Y. Aizawa, T. Hattori, S. Okata, A. Tanaka, H. Horigome, N. Kokubun, M. Horie, K. Kamiya, K. Fukuda. Flecainide suppresses an arrhythmogenic substrate in Andersen-Tawil syndrome-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte, European Society of Cardiology (ESC) Congress, Roma, Italy, 8.27-31, 2016

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqmed1/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

服部 哲久 (Hattori Tetsuhisa)

滋賀医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：80638932