




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 595 号	氏名	増田 季美子
審査委員会委員	主査氏名	宮本 伸一	
	副査氏名	花田 礼子	
	副査氏名	松本 重清	
論文題目 Testosterone-mediated upregulation of delayed rectifier potassium channel in cardiomyocytes causes abbreviation of QT intervals in rats (ラット心筋細胞におけるテストステロンによる遅延整流カリウムチャネルの増加と QT 間隔の短縮)			
論文掲載雑誌名 The Journal of Physiological Sciences			
論文要旨 【緒言】思春期以降男性は女性より心電図の QT 間隔が短くなる。男性では QT 延長に伴う致死的不整脈に対する受攻性が女性に比べて低い一方で、早期再分極症候群などの QT 短縮を伴った不整脈疾患は多い。このような心臓電気生理学的性差は性ホルモンによって生じると考えられる。テストステロン(TS)は遺伝子転写を介して蛋白合成を制御する。心筋細胞の電気生理学的特性を規定するイオンチャネルに対するテストステロンの作用は未だ明らかでない。我々は TS が、心筋細胞の外向き K <sup>+</sup> チャネルの遺伝子・蛋白発現や機能を変化させ、心電図上の変化をもたらすと仮説を立て実験を行なった。 【研究対象および方法】8 週齢雄性ラットを正常コントロール群、精巣摘出による去勢群(去勢群)、去勢後に TS を腹腔内投与した群(去勢+Test 群)の 3 群に分け心電図のパラメータの比較を行なった。また同ラットの心筋組織を採取し、外向き K <sup>+</sup> チャネルをコードする mRNA の rt-PCR 法による定量評価、ウエスタンブロット(WB)法によるチャネル蛋白の定量評価を行なった。さらに新生仔ラット心室筋を単離し、チャネル電流に対する DHT の短期・長期作用をパッチクランプ法により検証した。また培養心筋細胞を用いて、転写因子を薬剤や siRNA で修飾した場合の遺伝子発現の変化を評価した。 【結果・考察】去勢ラットに TS を投与した 2 週間後に有意な QT 短縮を認めた。正常コントロールに比べて去勢群で KCNQ1 遺伝子の有意な発現減少を認め、去勢+Test 群では去勢による同遺伝子の去勢による発現減少が相殺された。他の K <sup>+</sup> チャネルをコードする KCND2 や KCNJ2 などの遺伝子は去勢や TS の影響を受けなかった。KCNQ1 がコードする Kv7.1 蛋白の発現は去勢群に比べて去勢+Test 群で有意に増加した。IK <sub>s</sub> のチャネル蛋白、及びそれをコードする遺伝子の発現が TS によって増加し、チャネル電流が増えることで心電図変化が生じる可能性が示された。DHT 投与 5 分では変化を認めなかったが、24 時間曝露した細胞では通常培養した細胞に比べて有意な IK <sub>s</sub> の増加を認めた。DHT は遺伝子・蛋白の発現増加を介してチャネル電流を増加させることが示された。KCNQ1 の転写開始領域に転写因子 SP-1 の結合部位が多数存在することが in silico モデルにより確認された。SP-1 阻害剤 mythramycin は DHT の有無に関係なく KCNQ1 発現を著しく抑制し、SP-1 が KCNQ1 の転写に必須であることが示された。 【結語】TS は SP-1 と共同で KCNQ1 の転写を調節し、Kv7.1 蛋白発現を介して心筋細胞の IK <sub>s</sub> を制御していると考えられた。本研究は心電図あるいは致死性不整脈に対する受攻性において見られる性差のメカニズムを一部解明したものであり、致死性不整脈の基質を標的とした性差医療の発展に寄与するものである。			

最終試験  
の結果の要旨  
~~学力の確認~~

審査区分 ①・論	第595号	氏名	増田 季美子
審査委員会委員	主査氏名	宮本伸二	①
	副査氏名	花田 礼子	②
	副査氏名	松本 重清	③
<p>学位申請者は本論文の公开发表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. ラットモデルにおいて、ヒトと同様にQT間隔の性差は認められるのか。</li> <li>2. テストステロンの非ゲノム作用とは何か。またそれはどのような分子メカニズムのことか。</li> <li>3. 新生仔マウスの心筋細胞はhomogenous (均一) な細胞か。</li> <li>4. QT cの計測はどのように行ったのか。装置による自動計測なのか。</li> <li>5. 成長期のラットでは成長に従ってQT間隔が短縮すると思われるが、その影響はないのか。</li> <li>6. 心拍数が非常に速いラットにおいて、QT間隔を評価する上での注意点は何か。</li> <li>7. テストステロンを腹腔内投与した場合、血中濃度や薬物分布や日内変動はどうなるのか。去勢されていないラットや雌のラットと比較してどうなのか。</li> <li>8. パッチクランプ実験において、Macroscopic IKsを測定しているが、その細胞が心筋細胞であることをどのように識別しているのか。また、得られた電流がIKsと識別する根拠は何か。</li> <li>9. RT-PCR実験におけるPCR産物の確認において、sequenceでの確認はおこなったか。</li> <li>10. テストステロン投与による心電図上のQT短縮作用が認められるのに2日以上かかっているが、このtime lagに関してはどのようなメカニズムが考えられるか。</li> <li>11. CREB mRNAの発現量を検討しているが、CREBの活性化(リン酸化CREB)の蛋白量は検討したか。</li> <li>12. Fig. 5の結果では、DHTによりSP-1が変化していないが、どのように考えればいいのか。</li> <li>13. モチーフ検索にて、Kv7.1 のラットとヒトでのSP-1 binding site数が異なるが、binding site数が異なることで生理的な作用の違いがあると考えられるか。</li> <li>14. KCNQ1遺伝子欠損マウスにおいても、心電図異常の表現型が認められるのか。</li> <li>15. DHTによるKCNQ1 遺伝子のメッセージ発現調節に先行して、心筋核内で活性化するSP-1以外の転写因子は存在するか？</li> <li>16. DHT-ARとSP-1を介するKv7.1発現調節にはどのような分子メカニズムが考えられるか。</li> <li>17. Kv7.1を増加させる他の薬剤は何かあるのか。またKv7.1を増加させることにより不応期が短縮し、催不整脈性が高まる可能性はあるのか。その可能性があるのであれば、Kv7.1を阻害するKチャンネル遮断薬が催不整脈性に対して有効となる可能性はあるのか。</li> </ol> <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。